

Université de Montréal

Contribution des réserves calciques présynaptiques et gliales
dans la modulation de la transmission synaptique
à la jonction neuromusculaire de la grenouille *Rana pipiens*

Par
Annie Castonguay

Département de physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor*
en sciences neurologiques

Février 2005

© Annie Castonguay



W

4

U58

2005

V.152

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Contribution des réserves calciques présynaptiques et gliales
dans la modulation de la transmission synaptique
à la jonction neuromusculaire de la grenouille *Rana pipiens*

présentée par:

Annie Castonguay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent Castellucci, président-rapporteur

Richard Robitaille, directeur de recherche

Arlette Kolta, membre du jury

Philip Haydon, examinateur externe

et Vincent Castellucci, représentant du doyen de la FES

Résumé et mots clés en français

Le système nerveux est composé de deux principaux types cellulaires : les neurones et les cellules gliales. Depuis leur première description par Virchow en 1846, les cellules gliales avaient été considérées comme des cellules de soutien au fonctionnement neuronal, seul responsable du transfert et de l'intégration de l'information dans le système nerveux. On croyait alors que le rôle des cellules gliales se limitait au maintien structural des connexions neuronales ainsi qu'à l'équilibre ionique du milieu extracellulaire.

Or, certaines cellules gliales, les cellules gliales périssynaptiques, sont intimement associées aux synapses et envoient des prolongements jusqu'au niveau de la fente synaptique. Depuis le début des années 90, des évidences ont montré que les cellules gliales périssynaptiques pouvaient détecter la présence de neurotransmetteurs dans les synapses auxquelles elles sont associées, grâce à leurs récepteurs de surface. De plus, il a été montré que le métabolisme des cellules gliales périssynaptiques pouvait être modulé par la présence de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, sous la forme d'élévations calciques intracellulaires.

Le but des études présentées dans cette thèse vise à comprendre les effets des élévations calciques gliales au niveau du fonctionnement synaptique. Pour ce faire, nous avons utilisé la préparation de jonction neuromusculaire du muscle *cutaneus pectoris* de la grenouille *Rana pipiens*. Nos résultats indiquent que, suite à l'élévation de leur concentration calcique intracellulaire, les cellules gliales périssynaptiques de cette préparation peuvent avoir en retour des effets potentialisateurs sur la transmission synaptique. Les implications d'une telle modulation gliale sur la transmission synaptique sont discutées en rapport avec les caractéristiques fonctionnelles et les différents phénomènes de plasticité de cette synapse, ainsi que dans le contexte de fonctionnement global du système nerveux.

À la lumière des études présentées dans cette thèse, il apparaît que les cellules gliales sont partie prenante du fonctionnement synaptique et qu'elles assurent avec les neurones le maintien et l'équilibre de la communication synaptique à travers le système nerveux.

Mots clés :

- 1- Interactions neurone – glie
- 2- Synapse
- 3- Cellule de Schwann périssynaptique
- 4- Cellules gliales
- 5- Plasticité synaptique
- 6- Réserves calciques intracellulaires
- 7- Transmission synaptique
- 8- Électrophysiologie
- 9- Imagerie calcique
- 10- Cutaneus pectoris

Abstract and english key words

The nervous system is composed of two principal types of cells: neurons and glia. From their first description by Virchow, in 1846, glial cells have been considered as the “glue”, keeping the structural integrity of neuronal networks. For over a century, it was believed that neurons were the only cells responsible for information processing and transfer throughout the nervous system, whereas glial cells performed supportive functions such as ionic regulation of the extracellular environment and trophic support for neuronal function.

However, a category of glial cells located perisynaptically are intimately associated with synapses and send processes near the synaptic cleft. These cells are found both in the central (astrocytes) and peripheral (perisynaptic Schwann cells) nervous systems. In the early 1990's, evidence began to stem out showing that perisynaptic glial cells could detect neurotransmitter in the synaptic cleft, using specific receptors located on their processes facing the synapse. Moreover, it was found that the metabolism of glial cells could be modified by neurotransmitters, which would cause intracellular Ca^{2+} elevations.

The goal of the studies presented in this Thesis was to better understand how these Ca^{2+} elevations in glial cells would influence synaptic function. We used a neuromuscular junction preparation (*cutaneus pectoris* of the frog *Rana pipiens*) to induce Ca^{2+} elevations in glial cells and assess their effects on synaptic transmission using electrophysiological and Ca^{2+} imaging techniques. Our results indicate that potentiation of synaptic transmission occurred following the elevation of Ca^{2+} concentration in perisynaptic Schwann cells. The implication of such a modulation on synaptic transmission is discussed in relation with the functional characteristics and different types of plasticity encountered at this synapse, as well as regarding the global functioning of the nervous system.

These studies confirm the idea that glial cells bring an important contribution to synaptic activity and that they are working together with neurons to regulate and modulate neurotransmission in the nervous system.

Key words:

- 1- Neuron – glia interactions
- 2- Synapse
- 3- Perisynaptic Schwann cells
- 4- Glial cells
- 5- Synaptic plasticity
- 6- Intracellular calcium stores
- 7- Synaptic transmission
- 8- Electrophysiology
- 9- Calcium imaging
- 10- Cutaneus pectoris

TABLE DES MATIÈRES

1	CHAPITE PREMIER : INTRODUCTION.....	1
1.1	PRÉAMBULE	1
1.2	LA SYNAPSE.....	4
1.2.1	<i>La libération présynaptique de neurotransmetteurs</i>	6
1.2.1.1	La synthèse, le routage et la maturation des vésicules synaptiques ..	7
1.2.1.2	L'ancrage des vésicules synaptiques.....	8
1.2.1.3	Mobilisation et fusion des vésicules synaptiques.....	9
1.2.1.3.1	Les rôles du Ca^{2+}	10
1.2.1.3.2	Les mécanismes de contrôle du calcium cellulaire	12
1.2.1.3.2.1	Entrée de Ca^{2+} extracellulaire.....	12
1.2.1.3.2.2	Canaux de fuite.....	13
1.2.1.3.2.3	Canaux calciques voltage-dépendants.....	14
1.2.1.3.2.4	Récepteurs-canaux.....	15
1.2.1.3.2.5	Pompes et échangeurs	16
1.2.1.3.3	Mécanismes intracellulaires de gestion du calcium	17
1.2.1.3.3.1	Le rôle des réserves intracellulaires	17
1.2.1.3.3.1.1	Les mitochondries	18
1.2.1.3.3.1.2	Le réticulum endoplasmique	20
1.2.1.4	Recyclage des vésicules synaptiques	24
1.2.2	<i>La transduction du message des neurotransmetteurs</i>	25
1.2.2.1	Vers la membrane postsynaptique.....	25
1.2.2.2	Vers l'élément présynaptique.....	27
1.2.2.3	Vers la glie.....	29
1.3	LA GLIE	30
1.3.1.1	La microglie :	31
1.3.1.2	La macroglie :	32
1.3.1.2.1	Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann ou la glie myélinisante.	32
1.3.1.2.2	Les cellules gliales synaptiques	32
1.3.1.2.2.1	Les astrocytes	32
1.3.1.2.2.2	Les cellules de Schwann périssynaptiques	34
1.4	LA JNM DE GRENOUILLE	35
1.5	LES MÉCANISMES DE PLASTICITÉ À COURT TERME.....	37
1.5.1	<i>La facilitation</i>	38
1.5.2	<i>L'augmentation</i>	39
1.5.3	<i>Potentialisation et potentialisation post-tétanique</i>	40
1.5.4	<i>Mécanismes de dépression synaptique</i>	42
1.6	VERS UNE SYNAPSE TRIPARTITE : AJOUT DE LA GLIE	44
1.6.1	<i>La glie est-elle modulée par l'activité neuronale?</i>	45
1.6.1.1	Au niveau du SNC.....	45
1.6.1.2	Au niveau du SNP	46
1.6.2	<i>L'activation de la glie a-t-elle des répercussions sur l'activité neuronale?</i>	47

1.6.2.1	Au niveau du SNC.....	47
1.6.2.1.1	Les vagues calciques	48
1.6.2.2	Au niveau du SNP	49
1.6.3	Présentation de l'article de revue paru dans « <i>Progress in brain Research</i> »	50
1.7	ARTICLE DE REVUE.....	52
1.7.1	<i>Perisynaptic glial cells</i>	53
1.7.2	<i>Glial cells are excitable</i>	56
1.7.2.1	Ion channels in glial cells:	56
1.7.2.2	Receptors for neurotransmitters:	57
1.7.2.3	Glial cells detect neuronal activity and synaptic transmission.....	58
1.7.2.4	Glial production and release of neuroactive substances:.....	61
1.7.3	<i>Glial cells as synaptic partners: evidence and implications</i>	64
1.7.4	<i>Heterogeneity of synapse-glia interactions</i>	65
1.7.5	<i>Functional glial micro-domains</i>	66
1.7.6	<i>Glial cells as functional integrators</i>	67
1.7.7	<i>Do glial cells convey parallel processing?</i>	71
1.7.8	<i>Conclusions</i>	72
1.7.9	<i>Acknowledgements</i>	74
1.7.10	<i>References</i>	75
1.7.11	<i>List of abbreviations</i>	82
1.8	RETOUR SUR L'ARTICLE DE REVUE	83
1.9	BUT DE LA THÈSE	84
1.9.1	<i>Objectifs</i>	85
1.10	RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION.....	87
2	CHAPITRE DEUXIÈME	99
2.1	INTRODUCTION.....	100
2.2	ARTICLE DU CHAPITRE DEUXIÈME	105
2.2.1	<i>Summary</i>	106
2.2.2	<i>Introduction</i>	107
2.2.3	<i>Materials and methods</i>	109
2.2.4	<i>Results</i>	113
2.2.5	<i>Discussion</i>	132
2.2.6	<i>Reference list</i>	140
2.3	DISCUSSION DU CHAPITRE DEUXIÈME.....	145
2.4	CONCLUSION DU CHAPITRE DEUXIÈME	146
2.5	BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE DEUXIÈME	147
3	CHAPITRE TROISIÈME	148
3.1	INTRODUCTION.....	149
3.2	ARTICLE DU CHAPITRE TROISIÈME.....	153
3.2.1	<i>Summary</i>	154
3.2.2	<i>Introduction</i>	155
3.2.3	<i>Materials and methods</i>	157
3.2.4	<i>Results</i>	161
3.2.5	<i>Discussion and conclusions</i>	172

3.2.6	<i>References</i>	175
3.3	DISCUSSION ET CONCLUSION DU CHAPITRE TROISIÈME.....	178
3.4	RÉFÉRENCES DU CHAPITRE TROISIÈME	180
4	CHAPITRE QUATRIÈME.....	181
4.1	INTRODUCTION.....	182
4.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	184
4.2.1	<i>Imagerie</i>	184
4.2.1.1	Chargement antérograde spécifique d'un indicateur calcique au niveau des terminaisons nerveuses.....	185
4.2.1.2	Photolyse et chargement glial.....	186
4.2.1.2.1	Utilisation du laser multiphoton pour la photolyse de Ca^{2+} encagé	186
4.2.2	<i>Enregistrements électrophysiologiques</i>	189
4.2.3	<i>Analyses</i>	190
4.2.3.1	<i>Imagerie</i>	190
4.2.3.2	<i>Électrophysiologie</i>	190
4.3	RESULTATS	192
4.3.1	<i>La photolyse de Ca^{2+} encagé avec le laser multiphoton peut être utilisée pour produire des élévations calciques au niveau des CSPs</i>	192
4.3.2	<i>Les paramètres de photolyse utilisés pour évoquer les élévations calciques dans les CSPs n'affectent pas l'homéostasie calcique des terminaisons nerveuses</i>	195
4.3.3	<i>L'exposition au laser multiphoton en l'absence de DMNP-EDTA n'a pas d'effet sur la transmission synaptique</i>	197
4.3.4	<i>L'élévation maximale et non-spécifique de la concentration calcique intracellulaire des CSPs induit une potentialisation de la transmission synaptique</i>	199
4.3.5	<i>Les grandes réponses calciques produites par la photolyse de Ca^{2+} encagé dans les CSPs induisent une potentialisation de la transmission synaptique</i>	201
4.3.6	<i>Les petites réponses produites par photolyse de Ca^{2+} encagé dans les CSPs induisent, elles aussi, une potentialisation de la transmission synaptique</i>	202
4.3.7	<i>Il n'y a pas de corrélation directe entre la taille des réponses calciques gliales, leur durée et les effets observés au niveau de la transmission synaptique</i>	204
4.4	DISCUSSION DU CHAPITRE QUATRIÈME.....	209
4.4.1.1	Les réserves calciques gliales.....	209
4.4.1.2	Mécanismes possibles	211
4.4.1.3	Perspectives.....	214
4.5	CONCLUSION DU CHAPITRE QUATRIÈME.....	215
4.6	REFERENCES DU CHAPITRE QUATRIÈME	216
5	CHAPITRE CINQUIÈME : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	217
5.1	LES CELLULES GLIALES ET LA MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE	218

5.1.1	<i>Cellules gliales périssynaptiques du SNC</i>	219
5.1.2	<i>Les cellules de Schwann périssynaptiques de la JNM</i>	224
5.1.2.1	Les réserves intracellulaires de la JNM.....	226
5.1.2.1.1	Les réserves calciques présynaptiques de la JNM	226
5.1.2.1.2	Les réserves calciques des CSPs	227
5.1.2.2	Actions potentialisatrices des CSPs	228
5.1.2.3	Actions inhibitrices des CSPs.....	230
5.1.2.3.1	Le NO	231
5.1.2.3.2	Le glutamate	232
5.1.2.4	Les effets de la Xestospongine C sur les réserves calciques de la JNM de grenouille	233
5.2	LES CSPs EFFECTUENT UN CONTRÔLE BALANCÉ ET INTÉGRÉ DE L'EFFICACITÉ SYNAPTIQUE	235
5.3	MODULATION GLIALE ET PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LA JNM.....	237
5.4	FACTEUR DE SÉCURITÉ ET MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE À LA JNM.....	239
5.5	PERSPECTIVES	242
5.6	RÉFÉRENCES DE LA DISCUSSION GÉNÉRALE.....	244
6	CHAPITRE SIXIÈME : CONCLUSIONS DE LA THÈSE	248

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE QUATRIÈME.....	181
-------------------------	-----

Tableau 1 : Amplitude et durée des différentes réponses calciques gliales et leurs effets potentialisateurs au niveau de l'amplitude des PPMs	205
---	-----

LISTE DES FIGURES

FIGURE DE L'INTRODUCTION.....	1
-------------------------------	---

Figure 1 Les mécanismes de contrôle du Ca^{2+} cellulaire	23
--	----

FIGURES DE L'ARTICLE DE REVUE DE L'INTRODUCTION.....	52
--	----

Figure 1 Synapse-glia anatomical relationship in the PNS and CNS.....	55
---	----

Figure 2 Bidirectional interactions between synapses and glial cells	60
--	----

Figure 3 Synapse-glia interactions at the amphibian neuromuscular junction.....	63
---	----

Figure 4 Glial cells as "Local Networks Integrators"	70
--	----

FIGURE DE L'INTRODUCTION DU CHAPITRE DEUXIÈME.....	100
--	-----

Figure 1 Schéma des interactions neurone-glie-neurone à la JNM de grenouille.....	102
---	-----

FIGURES DE L'ARTICLE DU CHAPITRE DEUXIÈME.....	105
--	-----

Figure 1 Distribution of tg labelling at the frog nmj.	114
---	-----

Figure 2 Thapsigargin causes a transient Ca^{2+} elevation in PSCs.	116
---	-----

Figure 3 Effects of thapsigargin on Ca^{2+} level of presynaptic terminals	118
---	-----

Figure 4 Thapsigargin prolongs Ca^{2+} clearance in nerve terminals	122
--	-----

Figure 5 Thapsigargin potentiates transmitter release.....	125
--	-----

Figure 6 Potentiation of synaptic transmission by PSCs.....	129
---	-----

Figure 7 Synaptic depression is modulated by PSCs	131
---	-----

Figure 8 Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial internal stores.....	135
---	-----

FIGURES DE L'ARTICLE DU CHAPITRE TROISIÈME.....	153
---	-----

Figure 1 Distribution of IP_3R_2 at the frog neuromuscular junction.....	163
--	-----

Figure 2 Ca^{2+} responses elicited in PSCs by agonists and synaptic activity	166
--	-----

Figure 3 XeC interferes with SERCA Ca^{2+} pumps	168
---	-----

Figure 4 Ca^{2+} transients recorded in nerve terminals following single pulse stimulation in the presence of XeC, tg or both.....	171
---	-----

FIGURES DU CHAPITRE QUATRIÈME.....	181
------------------------------------	-----

Figure 1. Comparaison des caractéristiques de la photolyse par simple photon et multiphoton	188
---	-----

Figure 2 : Élévations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des CSPs, induites par la photolyse de Ca^{2+} encagé à l'aide du laser multiphoton	194
---	-----

Figure 3 : Il n'y a aucun changement de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des terminaisons nerveuses induit par les paramètres maximaux de photolyse utilisés	197
---	-----

Figure 4 : En l'absence de DMNP-EDTA, l'exposition de la préparation au laser multiphoton ne provoque pas de changements de l'amplitude des PPMs	198
Figure 5 : La thapsigargin provoque une élévation maximale de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs qui entraîne une augmentation de la taille des PPMs	200
Figure 6 : Les grandes réponses calciques induites par photolyse dans les CSPs induisent une potentialisation de l'amplitude des PPMs	202
Figure 7 : Les petites élévations calciques intracellulaires des CSPs induisent une potentialisation de la transmission synaptique	203
Figure 8 : Aucun changement significatif n'est observé dans la potentialisation de la transmission synaptique en fonction de la taille ou de la durée des élévations calciques gliales	207

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2-APB	2-aminoethoxydiphenylborate
5-HT	sérotonine
AA	acide arachidonique
ACh	acétylcholine
AChE	acétylcholinestérase
ADP	adénosine diphosphate
AM	acetomethyl ester
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionique
ATP	adénosine triphosphate
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane- N' N' N' N' -tetraacetic acid
BK	bradykinine
$[Ca^{2+}]_i$	concentration calcique intracellulaire
CaMKII	calcium/calmoduline kinase II
CGRP	calcitonin gene related peptide
CICR	Calcium-induced calcium release
COX	cyclooxygénase
CPA	acide cyclopiazonique
CPM	courant de plaque motrice
CSPs	cellules de Schwann périssynaptiques
DAG	diacylglycerol
DMNP-EDTA	1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophényl)-1,2- diaminoéthane- N,N,N',N' -acide tétraacétique
DMSO	dimethyl sulfoxyde
E	epinephrine
F.M.	fibre musculaire
GABA	acide γ -aminobutyrique
GDP	guanosine bis-phosphate
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GMPc	guanosine mono-phosphate cyclique
GTP	guanosine tris-phosphate
IP ₃	inositol-1,4,5-trisphosphate
JNM	jonction neuromusculaire
mAChR	récepteur cholinergique muscarinique
MAG	Glycoprotéine associée à la myéline
MAO	Monoamine oxydase
mGluR1	Récepteur métabotrope du glutamate de type 1
MLCK	myosin light-chain kinase
MP	multiphoton
NACHR	récepteur cholinergique nicotinique
NE	norépinephrine
NEM	N-ethylmaleimide
NK1	neurokinine 1
NMDA	N-méthyl-D-aspartate

NO	oxyde nitrique
NPY	neuropeptide Y
NSF	Nem-sensitive factor
NT(s)	neurotransmetteur(s)
P ₀	protéine zéro
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PiP ₂	phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate
PITPs	phosphoinositide transfer proteins
PKC	protéine kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PPM(s)	Potentiel(s) de plaque motrice
PTP	potentialisation post-tétanique
RE	réticulum endoplasmique
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SP	simple photon
TG ou tg	thapsigargin
TPEN	tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine
TS	transmission synaptique
VS	vésicule synaptique
XeC	xestospongine C

DÉDICACE

À ma famille, la grande et la petite,
pour leur support et leurs encouragements

REMERCIEMENTS

Au cours de ces huit dernières années, j'ai eu la chance d'être entourée de gens qui m'ont fourni plusieurs occasions d'apprentissage, desquelles la science n'est qu'un aspect. Je remercie de tout cœur ces vrais amis et renonce à en faire ici la liste, sachant qu'ils se reconnaîtront 😊

1 Chapite premier : Introduction

1.1 *Préambule*

Afin de produire des réponses cohérentes et des réactions adéquates aux multiples situations rencontrées dans notre vie de tous les jours, le système nerveux doit acquérir l'information provenant des stimuli extérieurs et les intégrer de façon appropriée. Pour permettre cette intégration, différents relais nerveux seront mis à contribution et l'information provenant de l'extérieur sera transmise à plusieurs niveaux, de la périphérie vers le système nerveux central, où elle sera analysée et décomposée, en vue de la planification d'une réaction appropriée. Il est donc extrêmement important, voire vital que l'organisation du système nerveux permette une distribution rapide de l'information aux différentes portions du cerveau spécifiquement impliquées dans leur analyse, permettant ainsi l'élaboration d'une réaction adaptée.

Pour ce faire, le système nerveux est composé de milliards de cellules spécialisées (environ 1×10^{11}), les neurones, qui en constituent l'unité de base et forment entre eux un réseau de communication des plus efficaces. En effet, la vitesse de conduction ultrarapide des axones neuronaux (jusqu'à 120 ms^{-1}) assure une transmission efficace des influx nerveux à travers ceux-ci (Purves et al., 2001). De plus, les neurones établissent entre eux un grand nombre de connexions, leur permettant de recevoir, moduler et transmettre l'information devant être acheminée vers d'autres cellules nerveuses. Pour demeurer efficace, toute cette organisation

repose sur un système de communication neurone-neurone qui se doit d'être particulièrement rapide et précis : la synapse chimique.

Au site de la synapse, on retrouve un élément pré- et un élément postsynaptique, qui sont tous deux séparés par une mince fente synaptique (30 – 50 nm). C'est au niveau de la synapse que se transmet l'information d'un neurone vers la cellule postsynaptique. Pour assurer ce transfert, l'élément présynaptique libérera différents neurotransmetteurs (NTs) dans la fente synaptique, suite à l'entrée de Ca^{2+} induite par l'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison présynaptique. Les NTs voyageront ensuite vers l'élément postsynaptique possédant les récepteurs de surface particuliers pour les NTs retrouvés à cette synapse. Suite à l'activation des récepteurs postsynaptiques, il y aura dépolarisation de la membrane postsynaptique en vue de produire la réponse appropriée à la stimulation reçue.

Toute la séquence d'événements constituant la transmission synaptique (TS) est soumise à une stricte régulation à chacune des étapes qui la compose. Ainsi, la synapse n'est-elle pas seulement un site de relais de l'information, mais le message qui y est transmis peut aussi y subir différentes modifications. En effet, on dit de la synapse qu'elle est plastique, c'est-à-dire que sa façon de traiter l'activité qui lui parvient est modifiée par l'activité qui s'y est déroulée au préalable. La plasticité intervient suite à des patrons d'activité spécifiques pour modifier l'activité synaptique subséquente à plus ou moins long terme. Nous discuterons plus en détails des différentes formes de plasticité rencontrées à la section 1.5.

En plus des neurones, le système nerveux possède un autre grand type de cellules : les cellules gliales. Parmi celles-ci, les cellules gliales pérисynaptiques pourraient contribuer aux changements de l'efficacité synaptique.

Comme leur nom l'indique, les cellules gliales pérисynaptiques sont retrouvées aux sites synaptiques. Puisqu'elles entourent les terminaisons présynaptiques et que leurs prolongements sont situés près de la fente synaptique, elles sont extrêmement bien localisées pour détecter l'activité qui s'y déroule, grâce à leurs récepteurs de surface (Porter et McCarthy, 1997). De plus, il a déjà été montré que ces cellules sont activées par la libération de neurotransmetteurs (mis en évidence par des élévations calciques intracellulaires gliales) et que des changements de l'efficacité synaptique peuvent être détectés suite à leur activation (Vernadakis, 1996; Auld et Robitaille, 2003).

Puisque les changements plastiques reflètent une intégration de l'information transmise à travers les synapses, il importe d'élucider ces différents modes de fonctionnement, pour pouvoir comprendre le traitement que subit cette information aux niveau des sites synaptiques. Cette thèse s'intéressera plus particulièrement aux changements de la transmission synaptique d'origine gliale et à leurs effets au niveau du fonctionnement global de la JNM.

1.2 La Synapse

Dans le contexte de la synapse plastique, l'exocytose de NTs et neuromodulateurs ainsi que leurs effets au niveau pré- et postsynaptique sont les mécanismes déclencheurs des changements qui seront observés suite aux différents patrons d'activité. En effet, en plus de permettre la transmission de l'information vers l'élément postsynaptique par les NTs, l'exocytose des vésicules permet aussi la relâche de divers neuromodulateurs stockés dans les vésicules synaptiques (ATP, peptides etc...). Ces neuromodulateurs, relâchés en même temps que les NTs peuvent interférer avec le fonctionnement de la synapse. En effet, ces substances peuvent agir tant du côté pré- que postsynaptique pour modifier la transmission synaptique.

L'exocytose des NTs et neuromodulateurs associés ne peut donc se produire au hasard et doit être réglée de façon précise, afin d'assurer une fonction synaptique appropriée. Ainsi, plusieurs mécanismes de régulation existent à la synapse afin de contrôler adéquatement la libération de neurotransmetteurs et ses actions au niveau de l'élément postsynaptique, et donc la modulation de l'information qui transitera par la synapse.

Comme il a été mentionné plus haut, les cellules gliales périssynaptiques sont en contact étroit avec les sites synaptiques (Kuffler et al., 1966; Spacek, 1971). De plus, ces cellules détectent la libération de NTs, sont modulées par ceux-ci et peuvent en retour avoir des effets au niveau de la TS elle-même (Jahromi et al., 1992;

Haydon, 2001; Araque et al., 2002). Il importe donc d'intégrer les effets gliaux sur la transmission synaptique à notre compréhension du fonctionnement global des synapses.

Les effets gliaux sur la transmission synaptique doivent nécessairement passer par un des sites de régulation de la TS, soit au niveau de l'élément pré- ou postsynaptique.

Afin de bien comprendre les sites potentiels d'intervention gliale pouvant moduler la TS, il importe de bien comprendre comment se fait la régulation neuronale de la libération des NT et de connaître les mécanismes impliqués et susceptibles d'être des cibles de la régulation gliale :

À la jonction neuromusculaire (JNM) de grenouille, les cellules gliales sont en apposition directe avec les terminaisons nerveuses et envoient des prolongements autour de celles-ci, jusqu'au niveau de la fente synaptique (Peper et al., 1974; Couteaux et Pécot-Dechavassine, 1974; Jahromi et al., 1992). Ces prolongements sont retrouvés à tous les 1-3 μm le long de la terminaison présynaptique et s'étendent jusqu'aux zones actives, là où s'effectue la relâche des neurotransmetteurs et neuromodulateurs dans la fente synaptique (Robitaille et al., 1990). Les zones actives sont observées comme des zones denses en microscopie électronique et les vésicules synaptiques prêtes à être relâchées dans la fente synaptique se trouvent à son voisinage.

Suite à leur libération dans la fente synaptique, les NTs vont pouvoir stimuler leurs récepteurs postsynaptiques, présynaptiques et gliaux, afin de produire leurs effets à ces trois différents niveaux :

- Postsynaptique. Stimulation des récepteurs ACh nicotiques musculaires et dépolarisation membranaire menant à la contraction musculaire.
- Présynaptique. Autorécepteurs pour les NTs et neuromodulateurs. Règlent la libération de NTs.
- Glial. Activation du métabolisme glial en fonction du type d'activité synaptique évoquée. Induit en retour des changements de l'efficacité synaptique.

Chacune de ces étapes vont être détaillées à la section 1.2.2

1.2.1 La libération présynaptique de neurotransmetteurs

Dans les années 1950, Katz et ses collègues ont avancé l'idée que des vésicules synaptiques (quanta, ou paquets unitaires de NT) pourraient expliquer la relâche quantique de NTs qu'ils ont observé à la JNM (Fatt et Katz, 1952). Depuis ce jour, de nombreuses études ont été effectuées pour visualiser les vésicules synaptiques et comprendre les étapes menant à l'exocytose de leur contenu dans la fente synaptique. Ces études ont mis en évidence des mécanismes de régulation complexes, non seulement au niveau du processus de fusion des vésicules avec la

membrane présynaptique, mais aussi dans le routage, la maturation, l'arrimage des vésicules aux protéines intracellulaires et la mobilisation de cet assemblage pour le processus d'exocytose. Nous ne comprenons malheureusement pas encore toutes les étapes de l'exocytose.

Puisqu'il existe plusieurs étapes avant que le contenu des vésicules synaptiques soit relâché dans la fente synaptique, une modification de la fonction des protéines impliquées dans une ou plusieurs de ces étapes pourrait entraîner des changements dans l'efficacité synaptique et jouer un rôle dans la plasticité de la synapse. Si l'on admet la contribution gliale au phénomène de la TS, les étapes menant à la libération de NTs sont des sites potentiels où la modulation gliale pourrait provoquer des changements dans l'efficacité synaptique.

1.2.1.1 La synthèse, le routage et la maturation des vésicules synaptiques

Les lipides et les protéines membranaires servant à constituer les vésicules synaptiques sont synthétisés et assemblés dans le réticulum endoplasmique du corps cellulaire du neurone. Ils subissent ensuite des modifications au niveau de l'appareil de Golgi et doivent être spécifiquement acheminées vers les zones actives des terminaisons nerveuses. Des études chez les levures et les mammifères (cerveau de rats; Hsu et al., 1996) ont mis en évidence l'implication de complexes protéiques dans le routage des vésicules synaptiques vers les zones actives (Hsu et al., 1999).

Là, les vésicules en devenir subissent un processus de maturation qui implique leur fusion avec la membrane cellulaire et leur endocytose. Ce n'est qu'à l'intérieur

de ces vésicules dites « matures » que les NTs seront stockés en prévision de leur relâche pour la neurotransmission (Lin et Scheller, 2000). Les vésicules chargées doivent être spécifiquement acheminées aux zones actives, lieu où s'effectue la relâche des NTs dans la fente synaptique (Couteaux et Pecot-Dechavassine, 1974).

Il existe deux groupes de vésicules en attente d'être relâchées : le groupe de réserve situé en retrait de la membrane synaptique et le groupe des vésicules prêtes à l'exocytose, en proche apposition avec la membrane présynaptique (Pieribone et al., 1995). Il apparaît que le groupe de vésicules de réserve est principalement sollicité lors de simulation synaptique à haute fréquence (~ 20 Hz), alors que le groupe de vésicules prêtes à l'exocytose soutient la libération de NT à basse fréquence (0.2 Hz) (Kuromi et Kidokoro, 2003; Richards et al., 2003).

1.2.1.2 L'ancrage des vésicules synaptiques

Une fois arrivées à la zone active, les vésicules synaptiques peuvent être attachées à des protéines du cytosquelette et faire partie du groupe de vésicules de réserves. On croit que plusieurs protéines pourraient former un large complexe d'attachement des vésicules au niveau des zones actives pour faciliter le déplacement des vésicules vers la membrane présynaptique où aura lieu l'exocytose. Deux principales protéines sont pressenties pour jouer ce rôle : Piccolo (ou Aczonin) et Bassoon. Ces protéines partagent certaines caractéristiques importantes pour l'attachement des vésicules aux zones actives. Tout d'abord, leur grande taille et les multiples sites d'interactions protéine-protéine en font des candidats intéressants pour

la formation de complexes d'ancrage des vésicules au cytosquelette ou à la membrane présynaptique (Tom et al., 1998). De plus, des études en microscopie électronique ont montré que ces protéines sont spécifiquement localisées au niveau des zones actives, allant de la membrane présynaptique jusqu'à s'intercaler entre les vésicules du groupe de réserve (Sanmarti-Vila et al., 2000).

Il est possible que plusieurs groupes de protéines soient mis à contribution lors de l'ancrage des vésicules synaptiques au niveau des zones actives. Ainsi, les vésicules pourraient se déplacer le long du réseau formé par celles-ci pour s'approcher de la membrane présynaptique, et les amener en proche apposition avec les protéines du complexe SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) de la membrane présynaptique afin de préparer leur mobilisation et le processus de fusion.

1.2.1.3 Mobilisation et fusion des vésicules synaptiques

La mobilisation des vésicules synaptiques est nécessaire afin de libérer celles-ci du réseau protéique auquel elles sont attachées, afin de les amener vers la membrane présynaptique. La mobilisation des vésicules du groupe de réserve nécessite l'action de l'ATP, probablement utilisée par la calcium/calmoduline kinase II (CaMKII) ou la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) afin de phosphoryler la synapsine I et la myosine II (Kumakura et al., 1994; Mochida et al., 1994; Ryan, 1999).

Les vésicules qui ont été mobilisées à partir du groupe de réserve deviennent ancrées à la membrane présynaptique à l'aide de deux groupes de protéines spécifiques, l'un étant retrouvé à la surface des vésicules et l'autre au niveau de la membrane présynaptique. L'exocytose des vésicules synaptiques se produirait en deux étapes : 1) Le « priming » (dépendant de l'ATP) du complexe d'exocytose, à l'aide des facteurs NSF (NEM-sensitive factor) et PITPs (phosphoinositide transfer proteins), puis 2), la fusion rapide des membranes vésiculaire et présynaptique sous l'action du Ca^{2+} .

Le Ca^{2+} est nécessaire à l'exocytose des vésicules synaptiques (Fatt et Katz, 1952; Del Castillo et Stark, 1952). Cependant, les mécanismes précis de l'action du Ca^{2+} restent encore à éclaircir. Plusieurs des protéines et facteurs qui participent à ce processus restent à préciser, ainsi que leurs modes d'interactions. Voici un aperçu de notre compréhension des mécanismes qui sous-tendent ces étapes cruciales de la libération des neurotransmetteurs.

1.2.1.3.1 Les rôles du Ca^{2+}

Au début des années 50, on a proposé que le Ca^{2+} puisse jouer un rôle dans la libération quantique des NTs. En effet, il a été montré qu'en augmentant la $[\text{Ca}^{2+}]$ du milieu extracellulaire, on augmentait le contenu quantique des potentiels de plaque motrice (PPM) évoqués, sans toutefois changer la taille des PPM miniatures (Fatt et Katz, 1952; Del Castillo et Stark, 1952).

Étant donné une telle relation entre l'élévation calcique dans la terminaison nerveuse et la quantité de neurotransmetteurs libérés, il est important que plusieurs mécanismes de contrôle du Ca^{2+} soient présents dans les terminaisons afin d'assurer la régulation stricte de cet ion. Des changements dans ces modes de régulation et de contrôle de la concentration calcique des terminaisons nerveuses peuvent venir jouer un rôle dans la plasticité synaptique (Voir section 1.5 sur la plasticité synaptique).

Le Ca^{2+} entraîne l'exocytose du contenu des vésicules synaptiques avec un délai de moins de 1 ms et possiblement moins de 100 μs (Sabatini et Regehr, 1996). L'action très rapide du Ca^{2+} suggère que la grande majorité des étapes de fusion ont été complétées avant l'intervention du Ca^{2+} et que celui-ci n'agit que comme élément déclencheur pour catalyser la fusion des membranes. En effet, une étude récente démontre que l'assemblage de la synaptotagmine aux différentes protéines du complexe SNARE d'exocytose ne nécessiterait pas la présence de Ca^{2+} , mais que le Ca^{2+} serait seulement le déclencheur de la fusion des vésicules arrimées à la membrane de façon appropriée par les protéines du complexe SNARE et la synaptotagmine (Rickman et Davletov, 2003).

Le Ca^{2+} entraîne la relâche de NT avec deux constantes de temps : une composante synchronisée rapide (0,1 – 5 ms) qui requiert une grande concentration calcique et une autre composante, asynchrone et plus lente (5 – 500 ms) qui est activée par des concentrations calciques plus faibles (Barrett et Stevens, 1972; Goda et Stevens, 1994; Atluri et Regehr, 1998). La composante rapide est prépondérante dans les cas de stimulations à basse fréquence, tandis que la composante lente domine dans les cas de stimulation synaptique à haute fréquence (Hagler, Jr. et Goda, 2001).

Le Ca^{2+} entraîne la relâche de NT en se liant à des protéines spécifiquement localisées aux sites d'exocytose, qui détectent la présence de Ca^{2+} . Des études montrent que la synaptotagmine 1, pourrait être impliquée dans la reconnaissance du Ca^{2+} et le déclenchement de la fusion dans la relâche rapide de NT (Brose et al., 1992). De plus, le Ca^{2+} se lie plus facilement à la synaptotagmine lorsque cette dernière est liée à des phospholipides tels que ceux qui sont contenus dans les membranes, comme c'est le cas dans l'assemblage du complexe protéique d'exocytose. D'autre part, en plus de se lier avec les phospholipides membranaires, la synaptotagmine se lie aussi avec les protéines du complexe SNARE (Chapman, 2002), ce qui en fait un candidat de choix pour accomplir une fonction dans la fusion des vésicules synaptiques.

1.2.1.3.2 Les mécanismes de contrôle du calcium cellulaire

Puisque le Ca^{2+} joue un rôle aussi important dans l'exocytose des neurotransmetteurs et le bon fonctionnement cellulaire, la disponibilité et les concentrations de cet ion doivent être précisément contrôlées afin d'empêcher une neurotransmission désordonnée. Pour ce faire, de nombreux mécanismes sont utilisés par les cellules :

1.2.1.3.2.1 Entrée de Ca^{2+} extracellulaire

Le milieu extracellulaire constitue une source importante de Ca^{2+} , puisque celui-ci s'y trouve sous forme libre en beaucoup plus grande concentration qu'au niveau du cytosol. En effet, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre est de l'ordre de 1×10^{-4} mM alors que

celle du milieu extracellulaire est d'environ 1,5 mM. Ces importantes différences de concentration calciques intra- et extracellulaires créent une grande force de diffusion du Ca^{2+} vers l'intérieur de la cellule. De plus, puisque le potentiel de repos membranaire cellulaire est négatif (de l'ordre de -90 mV), les ions Ca^{2+} positivement chargés, seront attirés vers l'intérieur cellulaire en fonction de l'évolution du potentiel de celle-ci. Ainsi, immédiatement suite à l'ouverture des conductances calciques cellulaires il y aura une entrée de Ca^{2+} , qui tendra à amener le potentiel membranaire vers le potentiel d'équilibre du Ca^{2+} (~ 130 mV), jusqu'à l'atteinte d'un équilibre avec son gradient électrochimique.

1.2.1.3.2.2 Canaux de fuite

Les évidences de canaux membranaires dont l'ouverture serait médiée par l'intervention des réserves intracellulaires (store-operated Ca^{2+} channels) ont été mis en évidence au niveau de cellules non-excitables (Putney, Jr., 1986) et ont été reconnu depuis comme un mécanisme retrouvé chez pratiquement toutes les cellules non-excitables (pour revue voir Baranska et al., 1999). Ces canaux auraient pour principale fonction de remplir les réserves calciques intracellulaires, suite à leur vidange par différents stimuli. La pertinence d'un tel système au niveau des cellules nerveuses demeure cependant controversée. En effet, les cellules nerveuses, possèdent un grand nombre de conductances calciques, toujours plus ou moins actives, de sorte qu'il soit rare que le Ca^{2+} cytosolique vienne à manquer pour remplir les réserves intracellulaires via l'action des ATPase de celles-ci. Dans ce contexte, la pertinence d'un tel mécanisme d'entrée de Ca^{2+} dans la cellule demeure incertaine.

1.2.1.3.2.3 Canaux calciques voltage-dépendants

Il existe plusieurs types de canaux calciques voltage-dépendants. Ces canaux ont d'abord été regroupés selon le type de courant et leurs caractéristiques physiologiques et pharmacologiques. Plus récemment, une nouvelle nomenclature plus systématique a été établie en fonction de la famille de gène de la sous-unité α_1 formant le canal.

Canaux de type L ($Ca_v1.1-4$). Ces canaux, retrouvés au niveau des muscles, cellules endocrines, neurones et cellules gliales, requièrent une grande dépolarisation afin d'être activés. Ils sont impliqués dans les processus de contraction et de sécrétion et sont bloqués par les dihydropyridines, les alkylamines et les benzothiazépines. À la JNM de grenouille, ces canaux calciques jouent un rôle dans l'exocytose de neurotransmetteurs suite au passage d'un potentiel d'action et sont souvent associés à des canaux K^+ Ca^{2+} -dépendants, afin de limiter la durée de la dépolarisation de la terminaison nerveuse (Robitaille et Charlton, 1992).

Canaux de type N ($Cav2.2$), P/Q ($Cav2.1$) et R ($Cav2.3$). Comme les canaux de type L, ces canaux requièrent aussi une importante dépolarisation pour être activés, mais ne sont cependant pas affectés par les antagonistes des canaux calciques de type L. Les bloqueurs de ces canaux sont des toxines retrouvées dans les venins de certaines araignées et serpents. Les canaux de ce groupe sont principalement retrouvés au niveau des neurones, où ils activent le processus de neurotransmission.

Par exemple, à cause de leur seuil d'activation bas et leur inactivation rapide, on croit que les canaux de type R retrouvés dans la zone dendritique du noyau supraoptique de rat, participeraient à l'entrée de Ca^{2+} suite au passage d'un potentiel d'action, alors que les types N et P/Q avec leur seuil élevé et leur cinétique plus lente seraient recrutés pendant les bouffées d'activité (Joux et al., 2001).

Canaux de type T (Ca_v3.1-3). Ces canaux sont activés par de faibles dépolarisations et leur ouverture est transitoire. Ces canaux ne sont pas affectés par les bloqueurs des 2 premiers types de canaux et ils sont exprimés dans plusieurs types cellulaires, où ils participent au contrôle des patrons de décharge et servent à définir les caractéristiques des potentiels d'action (Perez-Reyes, 2003).

1.2.1.3.2.4 Récepteurs-canaux

Contrairement aux canaux calciques voltage-dépendants, les récepteurs-canaux ne permettent pas une grande sélectivité pour un ion donné, mais sont couplés à des canaux dont la perméabilité est élevée pour plusieurs cations ou anions. Ces canaux, sans être très sélectifs favorisent cependant le passage de certains ions plus que d'autres. Parmi ces canaux, on en distingue deux principaux types qui favorisent le passage du Ca^{2+} lors de leur ouverture : celui du récepteur NMDA au glutamate, ainsi que celui couplé au récepteur à l'ATP (P2X). Ces deux canaux, lorsqu'ils sont ouverts laissent passer des quantités de Ca^{2+} suffisantes pour entraîner des répercussion physiologiques au niveau des cellules qui les expriment.

1.2.1.3.2.5 Pompes et échangeurs

On retrouve aussi des pompes et des échangeurs d'ions à la surface des cellules, afin de maintenir les gradients de concentration ionique cellulaires déterminant leur potentiel de repos.

La pompe Na^+/K^+ ATPase. C'est la pompe membranaire la plus répandue dans les neurones et autres cellules animales et on estime que 35 à 40% de l'énergie utilisée par le cerveau est reliée à l'activité de la Na^+/K^+ ATPase. Cette pompe, inhibée par la ouabaine (Doris, 1994), sert à maintenir les gradients ioniques du Na^+ et du K^+ en faisant sortir le Na^+ et entrer le K^+ . On la dit électrogénique, puisque pour trois ions Na^+ sortis de la cellule, seulement deux ions K^+ sont transportés dans la cellule, ce qui contribue à assurer le maintien du potentiel de membrane négatif au repos (Horisberger, 2004).

La pompe calcique dépendante de l'ATP. La pompe calcique membranaire est la principale responsable de l'extrusion du Ca^{2+} du cytosol vers le milieu extracellulaire, afin de maintenir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de l'ordre du nanomolaire (Zylinska et al., 2002).

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Cet échangeur, retrouvé dans pratiquement toutes les cellules animales, est un important mécanisme d'échange du Ca^{2+} contre le Na^+ dans un rapport de 1 pour 3. Cet échangeur est réversible et peut aussi bien favoriser la sortie que l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule dans certaines conditions (force électromotrice créée par les $[\text{Ca}^{2+}]$, $[\text{Na}^+]$, et $[\text{K}^+]$ de part et d'autre de la membrane

plasmique et le potentiel de membrane). L'ATP n'est pas nécessaire au fonctionnement de l'échangeur, mais en modifie la cinétique de transport ionique. Comparativement à la pompe Ca^{2+} ATP-dépendante, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a une affinité 10 fois moindre pour le Ca^{2+} mais au taux de transfert de 10 à 50 fois supérieur à celui de la pompe Ca^{2+} -ATPase (Blaustein et Lederer, 1999).

1.2.1.3.3 Mécanismes intracellulaires de gestion du calcium

Toujours dans le but de garder le contrôle de la $[\text{Ca}^{2+}]$ cytosolique, il existe en plus des mécanismes membranaires d'extrusion du Ca^{2+} des mécanismes de séquestration et de relâche intracellulaires : ce sont les réserves calciques intracellulaires.

1.2.1.3.3.1 Le rôle des réserves intracellulaires

Puisque le Ca^{2+} est un messenger second aux multiples fonctions cellulaires, il importe que sa présence dans le cytoplasme soit contrôlée dans l'espace et le temps. Dans ce but, les réserves calciques intracellulaires peuvent jouer deux principaux rôles :

- 1) Lorsqu'elles contiennent peu de Ca^{2+} , elles peuvent servir de tampon, afin d'aider à dissiper une élévation calcique cytoplasmique en séquestrant le Ca^{2+} .
- 2) Lorsqu'elles ont un contenu calcique élevé, elles peuvent servir de source de Ca^{2+} intracellulaire prête à être libérée lors d'une stimulation appropriée.

1.2.1.3.3.1.1 Les mitochondries

Ces organelles, retrouvées en grand nombre au niveau des terminaisons nerveuses ont entre autres pour fonction de fournir l'ATP à plusieurs processus nécessitant de l'énergie : sécrétion, fonctionnement des pompes membranaires etc. Dans la préparation de la synapse en ruban de la rétine, les mitochondries des terminaisons présynaptiques agissent comme source d'énergie pour faire fonctionner la pompe Ca^{2+} -ATPase membranaire qui constitue un des principaux moyen de contrôle de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à cette synapse (Zenisek et Matthews, 2000).

D'autre part, étant situées près des sites d'entrée du Ca^{2+} ainsi que du réticulum endoplasmique (RE), ces organelles possèdent une localisation favorisant leur intervention dans la cinétique des changements calciques présynaptiques localisés à la membrane. En effet, les mitochondries possèdent un système de transport Na^+ -dépendant et un autre Na^+ -indépendant (probablement médié par l'hydrogène) pour l'extrusion du Ca^{2+} . La capture du Ca^{2+} par les mitochondries est quant à elle sous tendue par un système d'accumulation rapide et un uniporteur à la cinétique plus lente (pour revue, voir Bernardi, 1999).

À la JNM de lézard, il a été montré que l'inactivation de la capacité tampon des mitochondries pour le Ca^{2+} lors de trains de stimulation provoquait une élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des terminaisons nerveuses de beaucoup supérieure à la normale (David et al., 1998). Chez la souris, cette inactivation du transport du Ca^{2+} dans les mitochondries provoque une réduction plus rapide du contenu quantique des PPMs pendant un court train de stimulation, ainsi que des fréquences plus grande de relâche

asynchrone (David et Barrett, 2003). Il semble donc que les mitochondries jouent un rôle important dans le maintien d'une transmission synaptique efficace lors de trains de stimuli causant une accumulation de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses.

Dans les astrocytes du cortex de rat, il a été montré que les mitochondries jouent un rôle de tampon calcique au niveau du cytosol. En effet, l'inhibition de la capture de Ca^{2+} par ces organelles augmente la vitesse de propagation des vagues calciques à travers les astrocytes (Boitier et al., 1999).

D'autre part, la relâche lente de Ca^{2+} suite à son stockage dans les mitochondries des terminaisons nerveuses après une période d'activité intense contribuerait à maintenir la $[\text{Ca}^{2+}]$ du cytosol plus élevée qu'en condition normale de repos. Ainsi, un stimuli parvenant à la terminaison nerveuse produirait une relâche de NT plus importante. Ces observations suggèrent un rôle des mitochondries dans la potentialisation post-tétanique (Tang et Zucker, 1997).

Les mitochondries peuvent donc non-seulement tamponner l'excès de Ca^{2+} du cytosol, mais aussi être une source de Ca^{2+} pour alimenter divers processus Ca^{2+} -dépendants, en plus de générer de l'ATP nécessaire au fonctionnement d'autres mécanismes de contrôle du Ca^{2+} .

1.2.1.3.3.1.2 Le réticulum endoplasmique

Le RE constitue la plus importante source de Ca^{2+} intracellulaire. Au niveau neuronal, le RE s'étend du corps cellulaire jusqu'aux dendrites et jusqu'aux terminaisons nerveuses via l'axone, formant la plus imposante organelle cellulaire. Cependant, le RE présente des morphologies très variées et adaptées à ses différentes fonctions locales.

En effet, on y retrouve des microdomaines de signalisation, où des rapprochements peuvent être effectués par certaines protéines adaptatrices pour placer en proche apposition les sites de production de certains messagers seconds et leur récepteurs-cibles du RE. Par exemple, la relâche de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique par la stimulation de ses récepteurs de surface pour l' IP_3 doit procéder par l'activation de la PLC. Pour assurer que l' IP_3 produit par la PLC ira le plus probablement stimuler la relâche de Ca^{2+} du RE, des protéines adaptatrices de la famille des « Homer » peuvent lier les mGluR1 et les récepteurs à l' IP_3 du RE des neurones du cervelet de rats (Tu et al., 1998). Cet arrangement assure une action efficace des messagers seconds suivant l'activation de leurs récepteurs de surface et pourrait être à l'origine d'élévations calciques restreintes dans ces neurones.

Le RE est donc lui aussi une réserve calcique dynamique qui règle la concentration calcique intracellulaire en effectuant la capture du Ca^{2+} ou en le relâchant dans le cytosol en réponse à des stimuli extracellulaires.

Il y a 2 types connus de réserves du RE :

Les réserves de type « Calcium-induced calcium release » (CICR) sont libérées suite à la stimulation de leur récepteur de surface par une élévation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} . Ce récepteur fut caractérisé par Pessah et ses collaborateurs en 1985. Ces réserves peuvent être mobilisées par la ryanodine (à faible concentration - $\sim 1 \mu\text{M}$ – la ryanodine maintient le récepteur ouvert) , la caféine et l'ADPribose cyclique (Brunder et al., 1992; McPherson et Campbell, 1993; Guse et al., 1999). Ce mécanisme de relâche calcique du RE est retrouvé au niveau central, mais aussi au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques de la JNM (Narita et al., 1998)

Les réserves à l' IP_3 , qui libèrent leur Ca^{2+} suite à la production l' IP_3 qui stimule son récepteur spécifique suite à sa production par la cascade des phosphoinositides. La stimulation d'un récepteur de surface membranaire couplé aux protéines G active la phospholipase C (PLC), qui induit à son tour la formation d' IP_3 , qui stimulera la relâche de Ca^{2+} du RE. Ce récepteur a été caractérisé par Supattapone et ses collaborateurs en 1988.

Le récepteur à l' IP_3 est modulé par la concentration calcique. Ainsi, une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ élevée au voisinage d'un récepteur à l' IP_3 en facilitera l'ouverture. Cette caractéristique pourrait servir à amplifier des signaux calciques déjà existants de façon à propager des signaux localisés (Patel et al., 1999). D'autre part, il est possible

que la synergie entre la $[Ca^{2+}]_i$ et l' IP_3 serve à détecter la présence simultanée de ces 2 mécanismes de signalisation intracellulaires (Hirose et al., 1998).

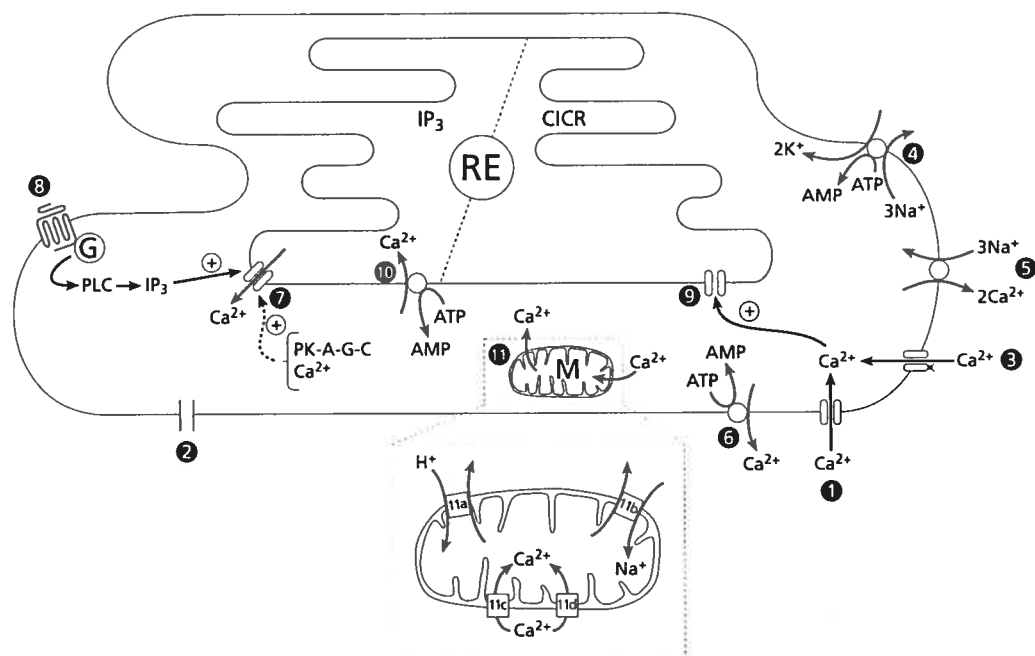
D'autre part, la phosphorylation du récepteur à l' IP_3 par les protéines kinases A, C et G (Mikoshiba et al., 1994; Mikoshiba, 1997) et la tyrosine kinase (Jayaraman et al., 1996) en augmente l'activité.

Le RE accumule le Ca^{2+} via un transport actif ATP-dépendant (Trotta et de Meis, 1975) pouvant être bloqué de façon irréversible par la thapsigargin (TG) et de façon réversible par l'acide cyclopiazonique (CPA). L'activité de la pompe calcique SERCA au niveau du RE est modulée par la $[Ca^{2+}]_{libre}$ de la lumière du RE. En effet, des protéines-tampon du Ca^{2+} du RE (calreticulin et Erp57) détectent la quantité de Ca^{2+} libre du RE et peuvent interagir avec les SERCA pour changer leur activité en fonction de la $[Ca^{2+}]_{libre}$ du RE (John et al., 1998; Li et Camacho, 2004). Les protéines-tampon du RE étant de faible affinité pour le Ca^{2+} , celles-ci assurent le maintien d'une concentration élevée de Ca^{2+} libre dans le RE, pouvant être libéré suite à un stimulus approprié.

La quantité de Ca^{2+} contenue dans le RE est modulée en fonction de l'activité de la cellule. En effet, suite à une entrée importante de Ca^{2+} extracellulaire, le RE se chargera de Ca^{2+} . Par la suite, la stimulation de la relâche des réserves du RE produit des réponses pouvant être augmentées jusqu'à 500%, tel que décrit pour les neurones de l'hippocampe de rat (tranches aiguës; Garaschuk et al., 1997). Ce mode de fonctionnement du RE pourrait favoriser le maintien d'une fenêtre de temps propice à discriminer la coïncidence de 2 stimuli.

Certaines évidences tendent à montrer que les récepteurs IP_3 et CICR provoquent la relâche du Ca^{2+} d'une même réserve physique dans les cellules de Purkinje du cervelet (Khodakhah et Armstrong, 1997), tandis que d'autres évidences montrent le contraire, dans les cultures primaires d'astrocytes (Golovina et Blaustein, 2000). Il est possible que des différences régionales existent et que différents modes de compartimentalisation des réserves du RE soient employés par différents types cellulaires, selon leurs besoins fonctionnels.

Figure 1 Les mécanismes de contrôle du Ca^{2+} cellulaire



1 : Canaux calciques voltage-dépendant. 2 : Canaux calciques de fuite (contrôlés par les réserves intracellulaires?). 3 : Récepteurs-canaux. 4 : Pompe Na^+/K^+ ATPase. 5 : Échangeur Na^+/Ca^{2+} . 6 : Pompe calcique ATP-dépendante. 7 : Récepteur à l' IP_3 . 8 : Récepteur couplé aux protéines G. 9 : Récepteur CICR. 10 : Pompe Ca^{2+} -ATPase des réserves intracellulaires (SERCA). 11. Transport mitochondrial assuré par : 11a : Transport Na^+ -indépendant, 11b : Transport Na^+ -dépendant, 11c : uniporteur calcique, 11d : Système d'accumulation rapide du Ca^{2+} .

1.2.1.4 Recyclage des vésicules synaptiques

Suite à la fusion des membranes vésiculaire et présynaptique, la membrane vésiculaire sera récupérée afin d'être réutilisée pour d'autres cycles d'exocytose. Il existe trois grands modes de recyclage des vésicules synaptiques, observés dans différentes préparations et selon l'intensité de la stimulation :

- 1) « Kiss and stay » Dans ce premier modèle, le pore de fusion permettant de relâcher les NTs dans la fente synaptique se referme alors que la vésicule synaptique reste ancrée à la zone active, où elle sera rechargée en NT pour la ronde d'exocytose suivante (Barker et al., 1972; synaptosomes du cortex de cochon d'inde). Ce mode d'exocytose est rencontré lors de stimulations à basse fréquence, lorsque la fusion d'un nombre restreint de vésicules est suffisante.
- 2) « Kiss and run » Des expériences menées par Ceccarelli et ses collaborateurs ont montré qu'à la JNM de grenouille (muscle *cutaneus pectoris*), les vésicules étaient endocytées, mais ne restaient pas ancrées à la zone active pour être de nouveau remplies de NT, d'où le nom de « kiss and run » attribué à ce mode d'endocytose (Ceccarelli et al., 1973). Ce mécanisme rapide de recyclage des vésicules synaptiques est aussi rencontré dans le cas de stimulations à basse fréquence. Les vésicules vides sont recyclées localement, mais ne restent cependant pas ancrées directement à la membrane présynaptique.
- 3) Endocytose via les clathrines. Mis en évidence par Heuser et Reese à la JNM de grenouille (muscle sartorius). Suite à des stimulations à haute fréquence

l'endocytose des membranes vésiculaires s'effectue via l'action de protéines spécifiques appelées clathrines. Les membranes vésiculaires sont recyclées suite à la fusion avec les endosomes cellulaires avant d'être de nouveau remplies de NT et de prendre part à un autre cycle d'exocytose (Heuser et Reese, 1973).

Subséquemment au recyclage des membranes vésiculaires, celles-ci seront réutilisées pour d'autres cycles d'exocytose. Les nouvelles vésicules, lorsqu'elles sont de nouveau chargées de NT vont reprendre leur place dans le groupe de vésicules de réserve, en attendant un autre cycle d'exocytose (Sudhof, 2000).

1.2.2 La transduction du message des neurotransmetteurs

1.2.2.1 Vers la membrane postsynaptique

La membrane postsynaptique est une région spécialisée du neurone qui est en proche apposition au site de relâche présynaptique et dont la fonction est de recevoir l'information qui lui est transmise par les différents transmetteurs.

Cette région est riche en récepteurs pour les différents neurotransmetteurs et neuromodulateurs présents à la synapse, de façon à pouvoir intégrer leur action et permettre à la cellule postsynaptique de produire une réponse appropriée selon la stimulation reçue.

Lorsque les NTs ont été libérés dans la fente synaptique, ils établissent la communication avec les neurones postsynaptiques en stimulant leurs récepteurs membranaires spécifiques. Les récepteurs postsynaptiques transforment alors les signaux chimiques reçus en signaux électriques au niveau du neurone postsynaptique, via des changements dans la conductance de canaux ioniques associés à ces récepteurs. La somme des changements de conductance au sein du neurone postsynaptique peut être excitatrice (augmente la probabilité de décharge du neurone) ou inhibitrice (réduit la probabilité de décharge du neurone).

Il existe deux grandes familles de récepteurs pour les neurotransmetteurs : les récepteurs ionotropiques et métabotropiques :

- 1) Les récepteurs ionotropiques (ou récepteurs-canaux) sont constitués d'une portion de reconnaissance du neurotransmetteur ainsi que d'un pore, ou canal. Le canal de ces récepteurs s'ouvrira par un changement de conformation suite à la liaison de leur ligand spécifique, permettant une action rapide au niveau de la conductance du neurone postsynaptique. On retrouve entre autres dans cette catégorie les récepteurs P2X pour l'ATP (Burnstock, 1996) et les récepteurs au glutamate de type AMPA, kainate et NMDA (Ozawa et al., 1998).
- 2) Les récepteurs métabotropiques contrôlent de façon indirecte l'ouverture des canaux ioniques, via l'action des protéines G. Ces récepteurs activent les protéines G avec lesquelles ils interagissent suite à la liaison de leur ligand spécifique. Les protéines G ainsi activées peuvent alors :

- i. se dissocier du récepteur et aller interagir directement avec des canaux ioniques pour en modifier la conductance. Par exemple, l'interaction directe de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ avec les canaux K^+ à rectification entrante entraîne l'ouverture de la conductance potassique, contribuant à l'apparition de potentiels postsynaptique inhibiteurs lents au niveau des neurones d'hippocampe (Sadjia et al., 2002).
- ii. Les protéines G activées vont stimuler d'autres effecteurs (souvent des kinases) qui iront à leur tour modifier certaines conductances de la cellule postsynaptique via des changements dans leur état de phosphorylation (pour un aperçu, voir Bertil Hille, 1992).

1.2.2.2 Vers l'élément présynaptique

Les NT libérés peuvent aussi agir sur des récepteurs présynaptiques ionotropiques ou métabotropiques spécifiques, dont les effets varient selon le type de synapse et les récepteurs impliqués (pour une revue plus complète, voir Engelman et Macdermott, 2004):

- 1) Les récepteurs ionotropiques non-perméables au Ca^{2+} mais perméables aux autres cations et aux anions (ex : Na^+ , K^+ , Cl^-) peuvent approcher ou éloigner le potentiel membranaire du seuil de déclenchement des potentiels d'action pour favoriser ou non la relâche de neurotransmetteurs.

- 2) Les récepteurs contrôlant des conductances perméables au Ca^{2+} peuvent moduler la relâche en modifiant les niveaux de Ca^{2+} intracellulaires de la terminaison nerveuse présynaptique.
- 3) D'autres effets peuvent inclure la production de substances neuromodulatrices (p. ex. le NO), ou la modulation de la relâche via l'activation de voies intracellulaires métabotropiques.

Des enzymes de dégradation peuvent également être présentes dans la fente synaptique afin de limiter l'effet de certains neurotransmetteurs sur leurs récepteurs spécifiques. C'est entre autres le cas de la monoamine oxydase (MAO) et de l'acétylcholinestérase (AChE) qui assureront respectivement la dégradation de la sérotonine et de l'acétylcholine.

D'autre part, des transporteurs peuvent ramener les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique à l'intérieur de l'élément présynaptique. Parmi ces transporteurs, notons ceux des monoamines (dopamine, sérotonine et noradrénaline) qui ont été largement étudiés. À la lumière de données récentes, il apparaît que l'action de ces transporteurs ne seraient pas seulement liée à la clairance des NTs de la fente synaptique, mais pourrait jouer un rôle important dans la plasticité de la synapse (Blakely et Bauman, 2000). En effet, l'activité intrinsèque, la composition protéique, ainsi que la disponibilité à la membrane de ces transporteurs peut être largement modifiée par l'action de leurs ligands (Apparsundaram, 2001).

Des transporteurs pour le glutamate sont aussi retrouvés au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques des neurones de l'hippocampe de rat (Chen et al., 2004), où ils peuvent réguler les quantités de glutamate présent dans la fente

synaptique et contribuer à la recapture de ce neurotransmetteur dans la terminaison nerveuse.

La présence de transporteurs gliaux pour les NTs a aussi été montrée, indiquant leur possible rôle dans la régulation du contenu en NTs de la fente synaptique. En effet, Kojima et al., ont montré que les transporteurs gliaux au glutamate de la région CA1 de l'hippocampe de rat jouent un rôle majeur dans le contrôle de la quantité de ce NT dans la fente synaptique. D'autre part, la présence de transporteurs au GABA au niveau des prolongements astrocytaires a aussi été mise en évidence dans certaines régions du cerveau de rat, comme par exemple la substance noire (Radian et al., 1990).

1.2.2.3 Vers la glie

Il est maintenant établi que les cellules gliales pérисynaptiques entourent de façon étroite les synapses auxquelles elles sont associées et se retrouvent ainsi en excellente position pour détecter l'activité synaptique qui s'y déroule. Lorsqu'il y a relâche de neurotransmetteurs et modulateurs dans la fente synaptique, ceux-ci vont aller stimuler leurs récepteurs postsynaptiques spécifiques, mais aussi leurs récepteurs gliaux. Il en existe plusieurs, selon le type de synapse, son stade de développement et les neurotransmetteurs et modulateurs qui y sont retrouvés (pour une revue voir Verkhratsky et Steinhauser, 2000).

En termes généraux, les récepteurs pour les neurotransmetteurs et modulateurs présents à une synapse donnée seront retrouvés au niveau de la cellule gliale pérисynaptique qui l'entoure.

Ainsi, à la JNM du muscle *cutaneus pectoris* de grenouille, on retrouve les neurotransmetteurs et modulateurs suivants : ACh, ATP, adénosine (produit de dégradation de l'ATP; Zimmermann, 2000) et la substance P. Les récepteurs gliaux rencontrés au niveau des cellules de Schwann périssynaptiques sont les récepteurs gliaux ACh muscarinique, ATP (P2X et P2Y), adénosine (A1), et les récepteurs NK1 pour la substance P (Robitaille, 1995; Bourque et Robitaille, 1998; Georgiou et al., 1999).

Puisque les cellules gliales périssynaptiques possèdent la machinerie nécessaire à la détection de l'activité se déroulant à la synapse qu'elles entourent, l'étape suivante consiste à savoir si leur activité est modifiée suite à différents patrons d'activité synaptique. Comme nous le verrons dans les sections suivantes, les cellules gliales périssynaptiques sont susceptibles de jouer plusieurs rôles importants dans le fonctionnement des synapses auxquelles elles sont associées.

1.3 La glie

Bien que les cellules gliales soient retrouvées en nombre supérieur à celui des neurones dans le système nerveux, les différents modes de communication du cerveau ont traditionnellement été étudiés du point de vue d'un transfert d'information des neurones exclusivement entre eux. Ainsi, depuis leur première description par Virchow en 1846 comme constituant une colle destinée à maintenir les neurones ensemble, les cellules gliales se sont vues attribuer systématiquement un rôle passif de soutien à la fonction neuronale, que ce soit au niveau ultrastructurel, trophique ou

comme régulateurs ioniques du milieu extracellulaire (Newman et al., 1984; Ballanyi et al., 1987; Bunge, 1994). Or, il existe plusieurs types de cellules gliales: la microglie, les oligodendrocytes et les astrocytes. Chaque type cellulaire possède des caractéristiques qui lui sont propres et qui lui permettent de jouer des rôles importants dans le maintien du bon fonctionnement neuronal.

Les différents types de cellules gliales seront brièvement décrits ici, mais l'emphasis sera principalement portée sur les astrocytes et les cellules de Schwann périssynaptiques, puisque ces cellules sont intimement associées aux synapses et qu'elles sont probablement les plus impliquées dans le phénomène de la transmission synaptique.

1.3.1.1 La microglie :

Comme leur nom l'indique, ces cellules sont les plus petites cellules gliales retrouvées au niveau du SNC. On pense que leur fonction principale serait de phagocyter les débris cellulaires laissés par les neurones et les cellules gliales en dégénérescence. Or, des évidences récentes montrent que le métabolisme de ces cellules peut aussi être activé par les astrocytes et provoquer de la neurotoxicité, dans certaines circonstances. En effet, la surexpression de cytokines par la microglie crée des réactions inflammatoires provoquant la dégénérescence neuronale dans la préparation (Bezzi et al., 2001).

1.3.1.2 La macroglie :

1.3.1.2.1 Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann ou la glie myélinisante.

Ces cellules gliales ont pour mission de favoriser la conduction à haute vitesse le long des axones neuronaux. Pour se faire, les oligodendrocytes (dans le SNC) et les cellules de Schwann (dans le SNP) s'enroulent autour des axones pour former plusieurs couches isolantes de leur membrane cellulaire. Entre les différentes cellules gliales subsiste un petit espace, appelé « nœud de Ranvier » au niveau duquel les canaux nécessaires à la propagation de potentiels d'actions sont localisés. Ainsi, les potentiels d'action se propagent de façon saltatoire, de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier, permettant des vitesses de conduction beaucoup plus grandes qu'au niveau des axones non myélinisés.

1.3.1.2.2 Les cellules gliales synaptiques

1.3.1.2.2.1 Les astrocytes

Dans le système nerveux central, les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses. Leur forme étoilée donne naissance à de nombreux prolongements qui ont le potentiel de s'associer à différentes structures :

- 1) *Les cellules endothéliales des capillaires sanguins.* L'association des podocytes astrocytaires avec les capillaires sanguins forme la barrière hémato-encéphalique, qui restreint l'accès de substances non-désirables (bactéries, substances toxiques etc...) au niveau du système nerveux central. D'autre part, les podocytes astrocytaires contiennent aussi des

transporteurs qui favorisent le passage des substance sanguines nécessaires au fonctionnement du SNC, comme le glucose, qui est sa principale source d'énergie. Des évidences récentes montrent que les astrocytes pourraient aussi contribuer à régler la constriction des vaisseaux sanguins auxquels ils sont associés (Zonta et al., 2003; Mulligan et Macvicar, 2004).

- 2) *Les synapses.* Alors que certains prolongements astrocytaires contactent les capillaires sanguins, d'autres prolongements iront s'associer à des sites synaptiques. Il a été montré qu'un seul astrocyte du cerveau de rongeur mature pourrait interagir avec 10 000 synapses différentes! (Bushong et al., 2004). Puisqu'un même astrocyte est en mesure de faire contact avec les capillaires sanguins et les sites synaptiques, il est possible que ceux-ci puissent véhiculer les substances nutritives du sang vers le SNC et inversement, se débarrasser de certains déchets métaboliques dans la circulation.
- 3) *Les nœuds de Ranvier.* Les astrocytes envoient aussi des prolongements vers les nœuds de Ranvier le long des axones myélinisés. En effet, il a été montré par des marquages à la peroxydase de raifort que les astrocytes envoient des prolongements vers la région périnodale, où ils se ramifient en petites digitations qui viennent se placer en proche apposition avec la membrane axonale (Butt et al., 1994). Plusieurs astrocytes différents peuvent contacter un même nœud de Ranvier et leurs réseau de ramification laisse entrevoir des mécanismes complexes de détection de l'activité se déroulant tant au niveau synaptique que le long des axones.

1.3.1.2.2 Les cellules de Schwann périssynaptiques

Ces cellules gliales sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires, dans le SNP. Contrairement aux astrocytes elles ne possèdent pas un grand nombre de prolongements, mais enveloppent les terminaisons nerveuses présynaptiques sur toute leur longueur et jusqu'au niveau de la fente synaptique.

Comme nous l'avons vu à la section précédente, les astrocytes et les cellules de Schwann périssynaptiques possèdent les récepteurs pour les différents neurotransmetteurs présents aux synapses auxquelles ils sont associés. Les astrocytes possèdent aussi différents transporteurs qui leur permettent d'agir sur la concentration synaptique de certaines substances neuroactives (p. ex le glutamate Bergles et Jahr, 1997; Bergles et Jahr, 1998; Anderson et Swanson, 2000).

Leur localisation anatomique privilégiée permet aux astrocytes (SNC) et aux cellules de Schwann périssynaptiques (SNP) de détecter la libération de NT, grâce à des récepteurs de surface spécifiques. De cette façon, ces cellules gliales peuvent être informées en temps réel de l'activité qui se déroule à la synapse qu'elles entourent.

Ce type de cellules gliales est extrêmement bien positionné pour jouer son rôle traditionnel de soutien à la fonction neuronale, mais ses caractéristiques permettent aussi de croire qu'elles pourraient être impliquées plus avant dans le phénomène même de la transmission synaptique.

Pour être considérées comme participantes à la transmission synaptique, les cellules gliales devront cependant faire plus que détecter l'activité synaptique, mais

aussi être modulées par celle-ci et finalement ajuster leurs effets sur le fonctionnement de la synapse en fonction de leur activation.

1.4 La JNM de grenouille

Les travaux de Georgiou (1999) ont confirmé que les cellules de Schwann périssynaptiques (CSPs) partageaient les caractéristiques moléculaires reconnues d'autres types de cellules gliales : les cellules de Schwann myélinisantes. Entre autres, il a été montré par (Georgiou et Charlton, 1999) que les CSPs expriment la Protéine Zéro (P_0) et la Glycoprotéine associée à la myéline (MAG ou myelin-associated glycoprotein). P_0 est une protéine largement associée à la myéline au niveau du SNP et son rôle principal serait de retenir ensemble et favoriser la stabilité les feuillettes de myéline compacte autour de l'axone moteur (Sommer et Suter, 1998). P_0 est exprimée tôt dans le développement des cellules de Schwann et est considérée comme un marqueur fiable des lignées de cellules de Schwann dès le stade de la crête neurale. Quant à elle, MAG est une glycoprotéine retrouvée dans la membrane périaxonale et serait impliquée dans le maintien de la gaine de myéline axonale, plutôt que dans l'induction de la formation des feuillettes de myéline par les cellules de Schwann (Martini et Schachner, 1997). Afin de montrer l'expression de P_0 et MAG au niveau des CSPs, des marquages ont été effectués sur des préparations dénervées (Georgiou et Charlton, 1999), où seules subsistaient les CSPs, les axones moteurs s'étant rétractés. Ainsi, non seulement l'expression des protéines P_0 et MAG sont-

elles confirmées au niveau des CSPs, mais leur expression ne dépend pas de leur contact avec les terminaisons nerveuses.

D'autre part, l'anatomie et l'organisation de cette JNM permet une identification visuelle facile de ses différentes composantes : les terminaisons nerveuses, les CSPs et les fibres musculaires et une induction contrôlée de la relâche de NT par la stimulation électrique du nerf moteur. Il s'agit aussi d'une synapse qui a longtemps été utilisée pour effectuer des enregistrements électrophysiologiques et dont l'ultrastructure est bien connue (Harlow et al., 2001).

L'activité synaptique à la JNM de grenouille induit des changements postsynaptiques mais aussi gliaux, qui laissent entrevoir une participation active de ces cellules dans le processus de la transmission synaptique (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1998). En effet, la stimulation du nerf moteur de cette préparation induit des élévations calciques au niveau des CSPs, qui possèdent les récepteurs pour les NT et neuromodulateurs libérés à cette synapse.

La JNM de grenouille présente aussi tous les types de plasticité synaptique à court terme connus : la facilitation, l'augmentation, la potentialisation post-tétanique et la dépression (Tanabe et al., 1995), qui peuvent être induits à la JNM par des stimulations appropriées du nerf moteur. La plasticité à court terme regroupe les changements qui affecteront la transmission synaptique d'une durée allant de quelques ms à quelques minutes et seront discutés plus en détail à la section 1.5.

Pour toutes ces raisons, il apparaît que la JNM de grenouille semble un excellent modèle pour l'étude de l'implication de la glie dans les phénomènes de plasticité synaptique à court terme.

1.5 Les mécanismes de plasticité à court terme

Tel que mentionné ci-haut, les mécanismes de plasticité synaptique à court termes sont tous retrouvés à la synapse neuromusculaire de la grenouille. Voici une brève description de ces différentes formes de plasticité retrouvées dans notre préparation.

À travers tous les systèmes étudiés jusqu'à maintenant trois principales formes de plasticité synaptique menant à la potentialisation de l'efficacité de la synapse ont été identifiées : la facilitation (rapide et lente), l'augmentation et la potentialisation postsynaptique. La dépression synaptique, de son côté, représente une forme de plasticité menant à une diminution de l'efficacité synaptique. Ces différentes formes de plasticité sont classées en fonction de leur constante temporelle d'inactivation à la suite de stimulations répétées. À l'aide d'analyses quantiques, il a été montré que les trois phénomènes de potentialisation avaient des origines présynaptiques. La limite de l'efficacité de la clairance calcique des terminaisons présynaptiques serait à l'origine de l'accumulation de Ca^{2+} présynaptique menant à l'augmentation de la relâche des NTs. Pour leur part, les mécanismes de dépression peuvent aussi avoir d'autres origines (postsynaptique ou gliale) tel que discuté plus loin, à la section 1.5.4.

1.5.1 La facilitation

À la JNM, la facilitation est observée au deuxième de deux stimuli lorsqu'ils sont appliqués dans un court intervalle (de l'ordre de la ms à la centaine de ms) au niveau du nerf moteur pour induire la TS. Le deuxième stimulus induit alors une réponse postsynaptique plus grande que le premier (pouvant aller jusqu'à 5 fois la taille du premier courant postsynaptique excitateur). C'est le phénomène de plasticité qui s'établit le plus rapidement: souvent, le décours temporel de la facilitation peut être estimé à l'aide d'une exponentielle d'environ 100 ms. Dans certains cas, la facilitation peut être décomposée en deux composantes principales : la facilitation rapide (F1), qui a une constante de temps d'une dizaine de ms et la facilitation lente (F2), qui a une constante de temps de l'ordre de la centaine de ms.

L'hypothèse la plus connue pour expliquer la facilitation est celle du Ca^{2+} résiduel. Cette hypothèse veut que la potentialisation synaptique soit le résultat de l'action du Ca^{2+} toujours présent dans la terminaison présynaptique suite au stimulus conditionnant au moment de l'arrivée d'un potentiel d'action subséquent. Appuyant cette théorie, il a été démontré à la JNM que la facilitation pouvait avoir lieu même lorsque la libération de NT est prévenue (Del Castillo et Katz, 1954; Dudel et Kuffler, 1961). Ces résultats sont grandement en faveur d'un rôle pour le Ca^{2+} , puisque la facilitation serait causée par un événement subséquent à l'envahissement de la terminaison nerveuse par le potentiel d'action, mais antérieur à la fusion des vésicules synaptiques. Le rôle direct du Ca^{2+} dans la facilitation a été mis en évidence par Katz

et Miledi (1968). Ces derniers ont utilisé une électrode focale pour appliquer du Ca^{2+} au niveau de JNMs baignées dans du milieu physiologique sans Ca^{2+} . Ainsi, ils ont pu montrer que la relâche de NT était abolie dans un milieu sans Ca^{2+} , mais surtout, que le stimulus conditionnant, lorsqu'il est présenté en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, ne parvenait pas à faciliter la relâche de NT pour les stimuli subséquents, contrairement aux stimulus conditionnants présentés en condition où le Ca^{2+} extracellulaire est présent.

1.5.2 L'augmentation

Lorsque le nombre de stimuli d'un train est augmenté, la facilitation fait place à l'augmentation, qui présente une durée de l'ordre de 5 à 10 secondes. Selon la synapse étudiée, chaque stimulus appliqué à la préparation potentialise l'efficacité synaptique de 1 à 15%. En effet, il a été montré à la JNM de grenouille (Magleby et Zengel, 1976), que l'augmentation est accentuée en relation avec la durée du stimulus conditionnant. Cependant, la constante de temps décrivant la fin du phénomène d'augmentation n'est pas significativement changée lorsque l'on allonge le stimulus conditionnant.

L'étape limitante de la fin de l'augmentation est l'élimination du Ca^{2+} résiduel présent dans la terminaison nerveuse. Or, à la JNM d'écrevisse, la présence de sérotonine (5-HT) pendant le stimulus conditionnant allonge la durée de l'augmentation, sans toutefois changer la cinétique de l'élimination du Ca^{2+} résiduel (Qian et Delaney, 1997). Les mécanismes d'action de la 5-HT ne sont pas encore entièrement élucidés, mais il est intéressant de constater que cette substance dissocie

la quantité de Ca^{2+} résiduel et l'augmentation. Il serait possible que la 5-HT ralentisse spécifiquement le processus responsable du décours temporel de la fin de l'augmentation, habituellement effectuée par le Ca^{2+} , mais d'autres expériences demeurent nécessaires pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène.

1.5.3 Potentialisation et potentialisation post-tétanique

La potentialisation post-tétanique (PTP) est un phénomène pouvant être observé dans une fenêtre de temps d'une trentaine de secondes jusqu'à quelques minutes et résulte de l'effet de l'application d'un train de centaines de stimuli. Comme son nom l'indique, la potentialisation post-tétanique est observée suite à l'arrêt du stimulus conditionnant, alors que la potentialisation aussi englobe les changements de l'efficacité synaptique pendant la stimulation. Puisque la PTP a une longue durée dans le temps, elle peut augmenter de plusieurs fois l'efficacité d'une synapse donnée. Tel que décrit pour l'augmentation, chaque stimulus appliqué augmente l'efficacité synaptique par rapport au stimulus précédent. Cependant, la PTP persiste plus longtemps dans le temps que l'augmentation et a une durée de 30 secondes à quelques minutes. Puisque la PTP et l'augmentation sont des phénomènes relativement semblables et qu'ils peuvent avoir lieu en même temps, il arrive que l'on soit dans l'impossibilité de faire la discrimination entre les deux phénomènes. On réfère alors à l'augmentation de l'efficacité synaptique résultante en tant que PTP.

Tout comme la facilitation et l'augmentation, la potentialisation post-tétanique est un phénomène d'origine présynaptique et passe par une augmentation du nombre de quanta de NT relâchés, sans qu'il y ait de changements dans le contenu quantique ou l'efficacité de l'élément postsynaptique (Pour Revue : Fisher et al., 1997). Plusieurs possibilités pour expliquer ces changements présynaptiques peuvent être mises de l'avant. Il peut s'agir de l'augmentation de la probabilité de relâche des quantas de NT disponibles pour l'exocytose et/ou une augmentation du nombre de sites de relâche pouvant participer à la neurotransmission. À leur tour, ces deux possibilités peuvent être sous tendues par une augmentation de la probabilité d'exocytose des vésicules ancrées à une zone active ou une augmentation de la probabilité qu'un site d'exocytose soit occupé par des vésicules prêtes à être relâchées (Worden et al., 1997).

On a aussi pu montrer un lien entre l'amplitude de la facilitation, l'augmentation et la potentialisation et la $[Ca^{2+}]_i$ résiduelle dans plusieurs préparations telles que le cervelet, au niveau de la synapse des fibres parallèles vers les cellules de Purkinje (Kreitzer et Regehr, 2000), la JNM (Delaney et al., 1989; Suzuki et al., 2000) et les ganglions ciliés chez le poulet (Brain et Bennett, 1995). En effet, avec l'apparition des indicateurs calciques ratiométriques, on a pu montrer une relation linéaire entre l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et l'amplitude de la potentialisation.

La capacité du Ca^{2+} résiduel à favoriser la relâche de NT est appuyée par le fait qu'en présence de Ca^{2+} résiduel, on observe une élévation de la fréquence des événements spontanés (Zucker et Lara-Estrella, 1983; Ravin et al., 1997).

Afin de confirmer le rôle du Ca^{2+} résiduel dans les phénomènes de facilitation, d'augmentation et de potentialisation, plusieurs autres stratégies ont été employées. On a montré que l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmentait la relâche de NT induite par l'arrivée d'un potentiel d'action, sans qu'il y ait eu de stimulus conditionnant (Delaney et Zucker, 1990; Kamiya et Zucker, 1994).

D'autre part, l'utilisation d'un chélateur de Ca^{2+} afin de diminuer l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, réduit la facilitation (Regehr et al., 1994) et l'augmentation (Stevens et Wesseling, 1999).

Enfin, la réduction de l'entrée de Ca^{2+} au niveau de la terminaison nerveuse (changement de la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracellulaire, blocage des canaux Ca^{2+} ...) réduit elle aussi la potentialisation (Zengel et al., 1993).

1.5.4 Mécanismes de dépression synaptique

Au niveau de plusieurs synapses, on assiste à une diminution de l'efficacité synaptique associée à une période d'activité intense. Cette diminution peut avoir plusieurs origines : la déplétion du groupe de vésicules synaptiques prêtes à l'exocytose, la relâche de substances neuromodulatrices de la terminaison nerveuse ou d'une cellule voisine (postsynaptique, gliale) ou encore la désensibilisation des récepteurs postsynaptiques.

L'adénosine est une substance qui a des effets dépresseurs au niveau de plusieurs synapses étudiées. L'ATP est co-relâchée avec plusieurs neurotransmetteurs et dans la fente synaptique, l'ATP est dégradée sous forme d'adénosine, qui va agir au niveau des récepteurs A1 présynaptiques pour diminuer la relâche de neurotransmetteurs. Dans le système nerveux central la diminution de la relâche de NTs passe par l'inhibition des canaux calciques de type L et N (Mynlieff et Beam, 1994; Mei et al., 1996), tandis qu'au niveau de la JNM, l'effet de l'adénosine ne passe pas par une réduction de l'entrée de Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse (Robitaille et al., 1999).

Au cours du développement (P5-7), la présence transitoire de récepteurs A1 présynaptiques au niveau de la synapse caliciforme de Held chez le rat est liée au blocage des conductances calciques présynaptiques (à l'exception des canaux Ca^{2+} de type N), afin de limiter la dépolarisation membranaire (Kimura et al., 2003).

Concrètement, lorsque l'on stimule une préparation donnée, il arrive que plus d'une forme de plasticité synaptique soit présente et que l'effet observé soit en fait la somme des formes de plasticité qui ont été recrutées par le patron de stimulation appliqué. De plus, les stimulations prolongées sont souvent accompagnées de dépression synaptique, de sorte que les effets potentialisateurs ne puissent être observés qu'après que la synapse ait récupéré de la dépression, masquant ainsi les premières manifestations de la potentialisation.

1.6 Vers une synapse tripartite : ajout de la glie

Les premières évidences d'interactions entre les neurones et les cellules gliales lors de l'activité neuronale ont été mises en évidence par Orkand et ses collaborateurs (1966), au niveau de différentes préparations d'amphibien (Orkand et al., 1966). Ce premier rapport fait état de la dépolarisation membranaire des cellules gliales à la suite de l'extrusion de K^+ qui survient après le passage de potentiels d'action, ce qui soulève la possibilité que la dépolarisation neuronale puisse agir comme un stimulus pour la cellule gliale.

Quelques années plus tard, en 1975, Villegas a montré que l'application d'agonistes cholinergiques en l'absence de stimulation nerveuse induisait une hyperpolarisation membranaire des cellules de Schwann au niveau de préparations neurone-glie de l'axone géant du calmar. Cette hyperpolarisation pouvait être bloquée par des antagonistes cholinergiques lorsque la stimulation nerveuse était utilisée pour induire l'hyperpolarisation des cellules de Schwann (Villegas, 1975). Ainsi, les cellules de Schwann de cette préparation possèdent des récepteurs pour l'acétylcholine, qui pouvaient être utilisés afin de permettre la communication neurone-glie.

1.6.1 La glie est-elle modulée par l'activité neuronale?

1.6.1.1 *Au niveau du SNC*

Les différents transporteurs et récepteurs pour les NT avaient été mis en évidence sur les cellules gliales pérисynaptiques, au niveau de leurs prolongements faisant face à la fente synaptique dans le cervelet (Usowicz et al., 1989), l'hippocampe, la substance noire et le cortex (Radian et al., 1990).

Le rôle de ces récepteurs gliaux a par la suite été étudié au niveau de plusieurs préparations du SNC. Il a été montré que non-seulement les astrocytes retrouvés au niveau synaptique possèdent les récepteurs aux différents neurotransmetteurs présents à la synapse (Kimelberg, 1995; Carmant et al., 1997; Bordey et Sontheimer, 2000) mais ceux-ci peuvent aussi produire une réponse, sous la forme d'une élévation calcique intracellulaire, en présence de ceux-ci (Sugino et al., 1984; Enkvist et al., 1989; Cornell-Bell et al., 1990). Les neurotransmetteurs endogènes sont donc en mesure d'activer le métabolisme des cellules gliales, sous la forme d'élévations de leur concentration calcique intracellulaire.

Le groupe de Cornell-Bell a montré que dans les astrocytes d'hippocampe en culture, l'application de glutamate induit des élévations calciques qui peuvent se propager à travers les astrocytes voisins, sans que ceux-ci aient directement été stimulés et jusqu'à plusieurs centaines de microns du site d'initiation. Ils ont qualifié ce phénomène de « vague calcique astrocytaire ». Depuis, ce phénomène a été mis en évidence dans d'autres préparations, notamment les astrocytes corticaux (Enkvist et

McCarthy, 1992) et la rétine (Newman et Zahs, 1997) pour une revue, voir Charles, 1998.

D'autre part, il a été montré à la synapse des collatérales de Shaeffer – cellules pyramidales dans le cervelet *in situ*, que l'activité du transporteur glutamatergique des cellules de Bergman était modifiée, créant un courant entrant dans ces cellules. L'activation du transporteur servirait entre autres à limiter l'action du glutamate dans la fente synaptique et procéderait par un mécanisme de rétroaction via l'élément présynaptique (Bordey et Sontheimer, 2003). Ce mécanisme limiterait la stimulation de plusieurs sites postsynaptiques lors de la libération à un site présynaptique donné (Marcaggi et al., 2003). Ceci empêcherait du même coup l'action du glutamate sur l'élément présynaptiques des interneurones inhibiteurs (GABAergiques) voisins (via le récepteur NMDA), ce qui a pour effet d'augmenter la relâche spontanée de GABA au niveau des cellules de Purkinje (Huang et Bordey, 2004).

1.6.1.2 Au niveau du SNP

À la JNM d'amphibien, la stimulation des CSPs par l'application locale de neurotransmetteurs tels que l'ATP, l'adénosine, la muscarine ou la SP provoquent des élévations calciques intracellulaires des CSPs, en stimulant leurs récepteurs gliaux spécifiques (Jahromi et al., 1992; Bourque et Robitaille, 1998; Rochon et al., 2001). Quant à elle, la stimulation du nerf moteur de la préparation induit aussi des élévation calciques gliales, qui sont fonction de la fréquence de stimulation (Jahromi et al., 1992).

1.6.2 L'activation de la glie a-t-elle des répercussions sur l'activité neuronale?

1.6.2.1 Au niveau du SNC

Puisque les cellules gliales périssynaptiques peuvent être modulées par l'activité synaptique, l'étape suivante consistait à déterminer si les cellules gliales ainsi activées pouvaient induire en retour des changements de la transmission synaptique.

Une telle influence gliale de la transmission synaptique a été montrée au niveau de plusieurs préparations : les tranches d'hippocampe (Pasti et al., 1997), les cellules d'hippocampe en culture (Araque et al., 1998a; Araque et al., 1998b) et dans la rétine *in situ* (Newman et Zahs, 1998), pour une revue voir (Newman, 2003). De plus, on a montré que les astrocytes de l'hippocampe sont aussi en mesure de relâcher du glutamate dans la fente synaptique, par un mécanisme utilisant les protéines du complexe SNARE (Araque et al., 2000; Zhang et al., 2004; Bezzi et al., 2004). Toutes ces études ont montré des changements de l'excitabilité des neurones au voisinage des astrocytes activés par la stimulation mécanique ou l'application de neurotransmetteurs endogènes à la synapse. Pour une revue voir (Auld et Robitaille, 2003).

1.6.2.1.1 *Les vagues calciques*

Il a aussi été montré que l'activité neuronale pouvait être modifiée au passage d'une vague calcique gliale au voisinage des neurones (Hassinger et al., 1995; Newman et Zahs, 1998) pour revue, voir (Verkhratsky et Kettenmann, 1996).

Le concept des vagues calciques gliales est particulièrement intéressant dans le cas où une vague calcique initiée à une synapse se propagerait vers des synapses distantes, pour en moduler l'activité. Ainsi, la modulation gliale de la TS s'effectuerait au niveau d'une synapse distante du site d'initiation de la vague calcique, et sans que les deux synapses en cause n'aient de lien direct entre elles. Bien que la preuve de l'existence d'un tel phénomène *in vivo* n'ait pas encore été faite, il existe des évidences qui montrent sa présence au niveau de la préparation de globe oculaire du rat *in situ* (Newman et Zahs, 1998).

Ces découvertes ouvrent la porte à une implication plus directe des cellules gliales dans la transmission synaptique et donc l'échange d'information à travers le système nerveux. De ce fait, il faudra repenser la vision traditionnelle de la communication exclusivement neuronale, afin d'y inclure l'influence gliale comme étant partie intégrante des mécanismes de modulation de l'information véhiculée à travers les synapses (Haydon, 2001).

1.6.2.2 Au niveau du SNP

À la JNM d'amphibien, les effets d'une modification du métabolisme glial ont été montrés par Robitaille, en 1998. En stimulant les voies couplées aux protéines G des CSPs par une injection spécifique d'un analogue non-hydrolysable du GTP, il a montré une diminution de l'efficacité synaptique.

D'autre part, la NO synthase est présente à cette JNM et l'application de NO sur la préparation induit une diminution de l'efficacité synaptique lors de stimulation à basse fréquence (mécanisme dépendant de la production de GMPc), tandis qu'à haute fréquence, le NO agirait via un mécanisme indépendant de la production de GMPc pour produire ses effets (Thomas et Robitaille, 2001).

Un système de signalisation glutamatergique a aussi été mis en évidence à cette synapse, que l'on croyait purement cholinergique. En effet, les récepteurs métabotropiques au glutamate sont retrouvés au niveau de la plaque motrice alors que les transporteurs au glutamate sont localisés sur les CSPs (Pinard et al., 2003). De plus, l'application de glutamate augmente la dépression synaptique induite par la stimulation à haute fréquence du nerf moteur de la préparation (10 Hz / 80 s), tandis qu'il est sans effets lors de la stimulation à basse fréquence (0,2 Hz). Ces résultats indiquent la présence d'un système de régulation par le glutamate ayant des effets fréquence-dépendants à la JNM de grenouille.

Ainsi, plusieurs exemples montrent que les cellules gliales font partie intégrante des synapses auxquelles elles sont associées et sont en mesure de participer à la modulation de l'efficacité de ces synapses de façon activité-dépendante.

Puisqu'elles sont activées par la relâche de neurotransmetteurs endogènes de façon activité-dépendante, les cellules gliales périssynaptiques pourraient être impliquées dans la plasticité de la synapse. En effet, ces cellules peuvent influencer la concentration de diverses substances neuroactives dans l'espace synaptique en contrôlant leur recapture, ainsi que libérer des substances neuromodulatrices comme le glutamate dans la fente synaptique.

1.6.3 Présentation de l'article de revue paru dans « Progress in brain Research »

Dans l'article qui suit, les principales découvertes qui ont mené à la conception du partenariat neurone-glie dans le transfert de l'information à la synapse sont discutés, ainsi que les implications possibles d'une telle modulation gliale de la transmission synaptique.

Tout d'abord, les cellules gliales périssynaptiques jouissent d'une localisation anatomique propice à la détection des changements ioniques dans la fente synaptique ainsi que d'une situation privilégiée pour la détection des neurotransmetteurs et neuromodulateurs présents. Elles sont en mesure de détecter ces changements, grâce à la grande variété de canaux ioniques et de récepteurs pour les neurotransmetteurs retrouvés à leur surface, aux sites de contact avec la fente synaptique. Ces cellules sont en mesure de détecter les substances neuromodulatrices présentes dans la fente synaptique et produisent une réponse à celle-ci, sous la forme d'une élévation de leur concentration calcique intracellulaire. La glie périssynaptique peut donc être

considérée comme étant excitable par l'activité neuronale. Suite à l'activation des cellules gliales périssynaptiques, il y a élévation de leur concentration calcique intracellulaire et initiation de cascades d'événements Ca^{2+} -dépendants pouvant agir en retour sur la transmission synaptique, via la relâche de substances neuromodulatrices par la glie elle-même.

L'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est plus ou moins circonscrite à l'intérieur de régions spécialisées de la glie synaptique en présence de faible activité neuronale, tandis qu'elle deviendra plus généralisée avec l'augmentation de la fréquence de décharge neuronale. Ces observations ont mené à l'élaboration du concept de microdomaines d'activation gliale, desquels peuvent « déborder » les élévations calciques lors de stimulation neuronale intense des cellules gliales.

Puisqu'ils peuvent être associés à plus d'une synapse, il est possible de penser que les astrocytes du SNC soient en mesure de moduler l'activité de plus d'un site de relâche de NT, suite à leur activation. De plus, si un astrocyte est associé à plus d'un type de synapse (ex. : GABAergique et glutamatergique; dans l'hippocampe) il est possible que l'activation gliale par un type de synapse, puisse avoir des répercussions sur d'autres types de synapses auxquelles cet astrocyte est associé, lorsque les élévations calciques gliales se généralisent à toute la cellule.

Autre fait à considérer, les cellules gliales du SNC forment entre elles un syncytium, à travers lequel peuvent se propager des vagues d'élévations calciques. Il apparaît donc possible que l'activation gliale produite à un site synaptique puisse avoir des répercussions sur des synapses distantes.

Dans les pages qui suivent, le lecteur trouvera l'article :

Castonguay A, Lévesque S et Robitaille R (2001) Glial cells as active partners in synaptic functions. *Progress in Brain Research* vol. 132 pages 227-240.

© Elsevier, 2001. Reproduit avec permission.

1.7 Article de revue

GLIAL CELLS AS ACTIVE PARTNERS IN SYNAPTIC FUNCTIONS

Annie Castonguay, Sébastien Lévesque and Richard Robitaille
Centre de Recherche en Sciences Neurologiques

and

Département de physiologie
Université de Montréal
Montréal, Canada
H3C 3J7

Please send correspondence to:

Richard Robitaille, Ph.D.
Département de physiologie
P.O. box 6128, Station Centre-Ville
Montréal, Québec
Canada, H3C 3J7
Tel #: (514) 343-6111 ext 1946
Fax #: (514) 343-2111

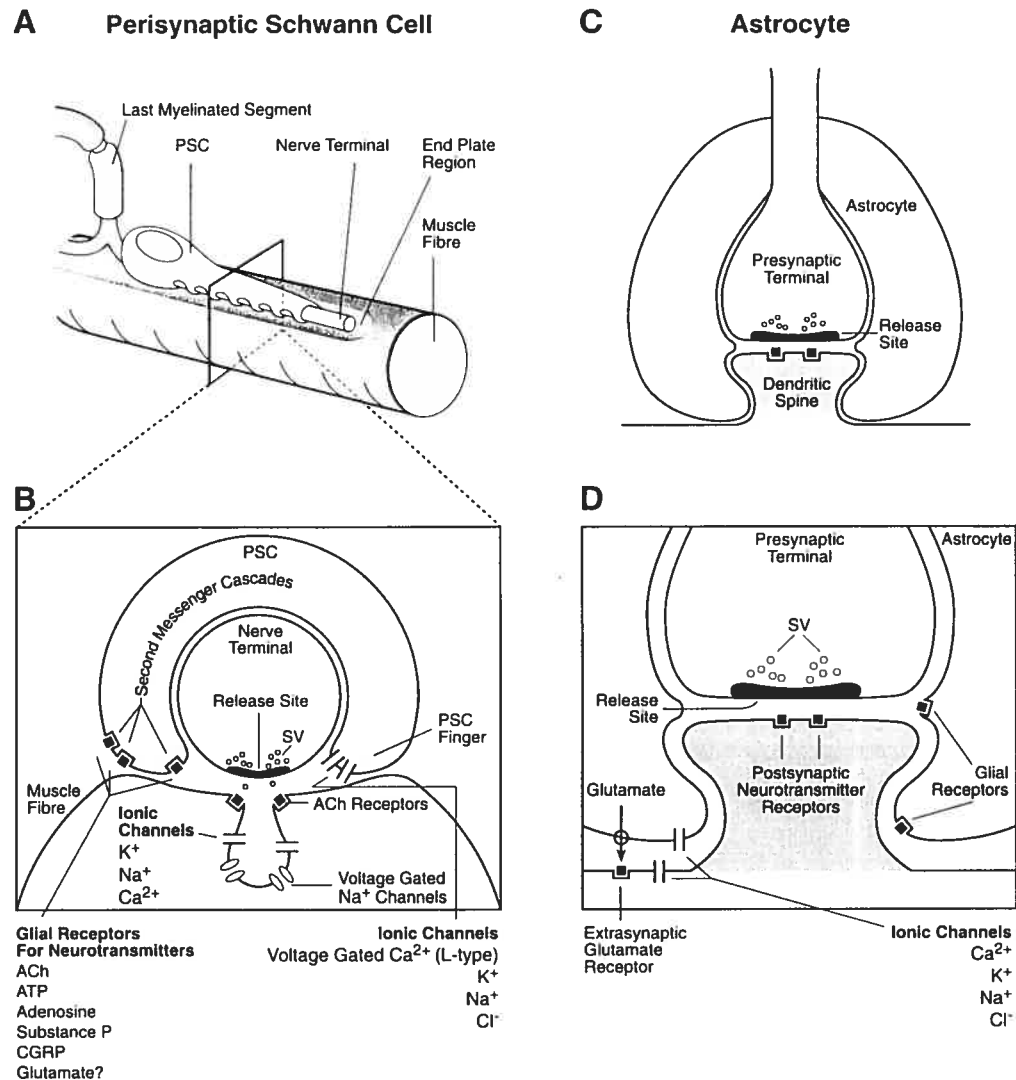
The numerically superior glial cells have been identified as the passive cells of the nervous system supporting neuronal functions. Although these regulatory roles played by glial cells are essential for the proper nervous system function (see Kettenmann and Ransom, 1995), still they were considered as subservient, non-excitabile elements. This view changed dramatically in the past decade where a number of observations lead to a redefinition of the glial cells as active and integrative elements involved in the functions of the nervous system. In particular, recent evidence strongly suggests that glial cells, both in the peripheral (PNS) and in the central nervous systems (CNS), are directly involved in the regulation of neuronal activity and synaptic transmission. From this emerged a new perspective where glial cells could act as active modulators and regulators of neuronal properties. In this review, we will present the evidence that lead to this dramatic change in the perspective of the glial cell functions. We will also discuss some possible implications that such a glial function could have on the most basic neuronal function that is, the transfer of information conveyed by chemical synapses.

1.7.1 Perisynaptic glial cells

For the purpose of this review we will focus on three main cell types that have been directly implicated in the interactions with neurons and synapses, that is, the astrocytes in the CNS, Bergmann glial cells of the retina and the cerebellum and the perisynaptic Schwann cells (PSCs) in the PNS. Perisynaptic glial cells are closely associated with synaptic sites, surrounding the pre- and postsynaptic elements of the

synapse and the synaptic cleft, thus delimiting the synaptic region (Figure 1). This anatomical organization is present both in the PNS and the CNS where glial cells send processes at proximity of the release sites (Jahromi et al., 1992; Ventura and Harris, 1999). Interestingly, about 60% of synapses in the hippocampus have apposed glial processes (Ventura and Harris, 1999). This privileged anatomical situation is ideal to allow perisynaptic glial cells to control over the ionic contents of the synaptic cleft as well as to sense synaptic activity. Therefore, due to this anatomical relationship with synapses, glial cells are strategically positioned to efficiently detect changes in synaptic activity and ionic balance, and actively participate in the regulation of the physiology of synapses (Hansson and Ronnback, 1990).

Figure 1 *Synapse-glia anatomical relationship in the PNS and CNS*



A) Schematic illustration of an amphibian nmj. A branch of a the nerve terminal formed from a last myelinated segment is covered by a perisynaptic Schwann cell (PSC). The nerve terminal is in contact with a muscle fiber at the endplate area. B) Diagram of a cross section of the amphibian nmj. In the presynaptic nerve terminal, synaptic vesicles (SV) are accumulated at the sites for transmitter release. Cholinergic receptors are clustered at the crest of postjunctional folds, in front of the release site on the muscle fiber,. Processes of PSCs cover the nerve terminal and send cytoplasmic extensions called PSC fingers near the release sites. It is postulated that receptors and certain types of ion channels are concentrated in the PSC fingers near the release sites to optimize the detection of neurotransmitters released by the terminal (Robitaille et al., 1996). C) Schematic representation of a synapse on a dendritic spine surrounded by an astrocytic process. D) Similarly to the nmj, synaptic vesicles (sv) are clustered at the sites for transmitter release in the presynaptic nerve terminal. Receptors are on the spine or dendrite of the postsynaptic neuron in front of the release site.

1.7.2 Glial cells are excitable

The notion that glial cells are active, excitable cells that could be involved in the regulation of neuronal activity and synaptic transmission evolved with the advent of techniques such as patch-clamp recordings and cellular imaging. Four major pieces of information are at the basis of such a dramatic change.

1.7.2.1 Ion channels in glial cells:

There is now a large body of evidence indicating that glial cells possess a wide variety of voltage-gated ion channels (Barres et al., 1990; Sontheimer, 1994; Vernadakis, 1996; Verkhratsky and Steinhäuser, 2000). In fact, almost all type of ion channels have been identified in glial cells. By far the most dominant voltage-gated ion channels found in all types of glial cells are the K^+ channels. The critical role of glial cells in buffering extracellular K^+ is one of the first mechanisms of glial regulation of the ionic environment (Kuffler et al., 1966; Orkand et al., 1966; Newman, 1984; Newman and Reichenbach, 1996). The Cl^- channels are another major group of ion channels in glial cells that are associated with control of extracellular pH and cell volume regulation (Deitmer and Rose, 1996). The other main class of ion channels found in glial cells are the Ca^{2+} channels, mainly the L and T types. They have been identified in cultured astrocytes (MacVicar et al., 1991), acutely isolated astrocytes (Duffy and MacVicar, 1994) and in slice preparations (Duffy and MacVicar, 1994). Owing to their permeability to Ca^{2+} , these channels could play a dynamic role in the regulation and activation of glial cells (Duffy and

MacVicar, 1996; Verkhratsky et al., 1998; Latour et al., 2000). L-type Ca^{2+} channels have been identified also in PSCs at the neuromuscular junction (nmj) where they appear clustered at the processes of the glial cells located at proximity of the release sites (Robitaille et al., 1996). Although glial cells cannot generate action potentials, they possess voltage-gated Na^+ channels found in astrocytes (Barres et al., 1989; Steinhäusser et al., 1994; Schaller et al., 1995) and on Schwann cells (Chiu, 1991). Na^+ channels may be involved in the maintenance of Na^+ homeostasis and the regulation of ion exchangers such as the Na^+/K^+ ATPase and the $\text{Na}^+/\text{glutamate}$ transporter.

1.7.2.2 Receptors for neurotransmitters:

The second element that lead to the concept of glial cells as active elements was the evidence for the presence of functional receptors (Chiu and Kriegler, 1994; Kimelberg, 1995; Shao and McCarthy, 1995; Vernadakis, 1996; Verkhratsky et al., 1998; Verkhratsky and Steinhäuser, 2000). Receptors for most of the neurotransmitters are found on glial cells, including ionotropic (non-NMDA) and metabotropic glutamate receptors (mGluR3 and 5; Schools and Kimelberg, 1999), GABAergic receptors, adrenergic receptors, purinergic receptors, cholinergic and serotonergic receptors. Glial cells also express functional receptors for various peptides including for substance P (SP), calcitonine gene related peptide (CGRP) and neuropeptide Y (NPY).

The obvious consequence of the presence of receptors is that it confers to the glial cells the ability to detect and monitor the activity of the synapse, thus providing

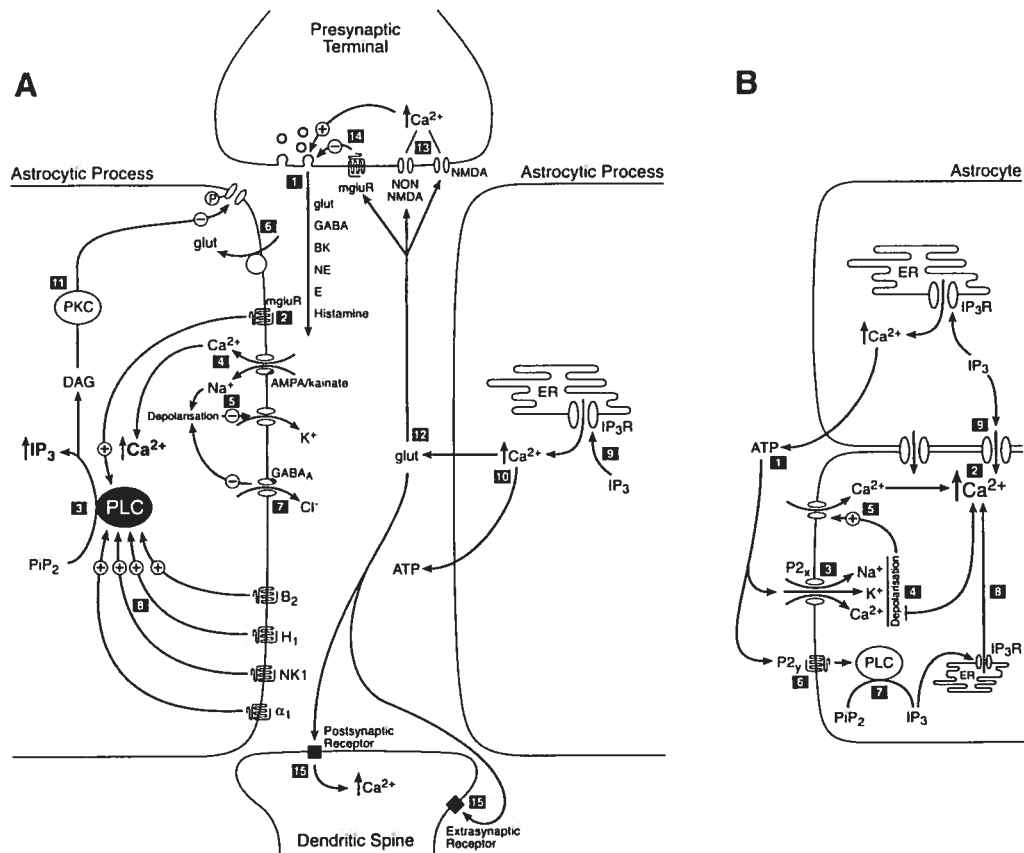
a direct evidence that glial cells could detect neuronal activity and synaptic transmission. A large proportion of receptors present on glial cells are associated with GTP-binding proteins. The presence of this type of receptor will have four major repercussions on the glial cell function: first, it will be governed by the activity of second messengers produced as a consequence of the receptor activation; second, the second messenger cascades allow a large amplification of the message carried by the neurotransmitter (Robitaille et al., 1997). Thus, a small amount of neurotransmitter is required to elicit an optimal response by glial cells. This would provide glial cells with a high degree of sensitivity to the synaptic changes; third, because second messengers can diffuse in cytoplasm, the information carried by second messengers can diffuse within the cell and through gap junctions to adjacent cells and, hence, transfer the modulation away from the synaptic site that triggered the production of second messengers (Finkbeiner 1993; Sneyd et al., 1994; Giaume and Venance, 1998; Bruzzone and Giaume, 1999); and fourth, the glial regulation of the environment will follow the slow time course and properties of those second messengers where the regulation of glial cell activity will be an intricate balance of interactions between the various enzymes and second messengers produced.

1.7.2.3 Glial cells detect neuronal activity and synaptic transmission

There is now evidence at intact CNS synapses (Figures 2A; Dani et al., 1992; Duffy and MacVicar, 1995; Porter and McCarthy, 1996, 1997; Pasti et al., 1997; Carmignoto et al., 1998; Grosche et al., 1999; Latour et al., 2000) and at amphibian and mammalian nmjs (Figure 3; Jahromi et al., 1992; Reist and Smith, 1992;

Georgiou et al., 1994, 1999; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Bourque and Robitaille, 1998; Rochon and Robitaille, 1999) that perisynaptic glial cells detect the release of neurotransmitters induced by neuronal activity. The activation of perisynaptic glial cells was determined by monitoring changes in intracellular Ca^{2+} . The large portion of the glial activation requires the release of neurotransmitters rather than just changes in extracellular ionic balance (Jahromi et al., 1992; Robitaille et al., 1996; Pasti et al., 1997; Araque et al., 1998a). Hence, this clearly indicates that perisynaptic glial cells can detect synaptic activity and that a Ca^{2+} -dependent cascade of events is triggered. The intimate relationship of glial cells with synapses and their ability to detect the release of neurotransmitters at synapses led us and others to propose that glial cells may be involved in the regulation of synaptic transmission (Jahromi et al., 1992; Smith, 1992, 1994; Parpura et al., 1994; Robitaille, 1995; Araque et al., 1999).

Figure 2 *Bidirectional interactions between synapses and glial cells*



Glial receptors and neurotransmitter transporters are believed to be on the processes near the synaptic cleft. Extrasynaptic glial receptors are also likely present. A) neurotransmitters will be released by presynaptic terminal following the depolarisation by an action potential and entry of Ca^{2+} (1). Neurotransmitters known to mediate a communication between nerve terminal and glial cells are: glutamate, GABA, epinephrine (E), norepinephrine (NE), bradykinin (BK), histamine, substance P (SP), etc. The most studied interactions are the ones mediated by glutamate. This excitatory amino acid released in the synaptic cleft interacts with glial metabotropic glutamate receptors (mGluR) (2), which activates a phospholipase C (PLC) resulting in the production of IP_3 and DAG (3). Glutamate also activates an AMPA/Kainate receptors causing a depolarisation of the astrocytes and a rise in cytoplasmic Ca^{2+} (4). This activity may result in a reduction of the outward K^+ rectification current (5) (Robert and Magistretti, 1997; for review see Verkhratsky and Steinhäuser, 2000). The effects of glutamate are terminated by a low affinity glutamate transporter located on astrocytes membrane that remove glutamate from the synaptic cleft (6) (Attwell, 1994; Mennerick and Zorumski, 1994). GABA_A receptors are also found on astrocytes and their activation results in a net efflux of Cl^- (7) and a depolarisation of the cell (Fraser et al., 1995) followed by a long lasting blockade of K^+ current (5) (Bekar and Walz, 1999). Other neurotransmitters like E, NE, BK, histamine and SP will also activates their specific metabotropic glial receptors α_1 , B_2 , H_1 , NK-1 that results in the stimulation of PLC (8) and increased IP_3 level in the cell (3) (for review see Verkhratsky et al., 1998). IP_3 promotes Ca^{2+} release from the internal stores of the astrocyte by activating an IP_3 -dependant channel

located on the endoplasmic reticulum membrane (9) (Finkbeiner, 1993). Thus, the main consequence of PLC activation is an increase of cytoplasmic Ca^{2+} (10). PLC also produces DAG that inactivates PKC which could phosphorylate ion channels (11) (Kimmelberg, 1995). As a consequence of the glial activation by neurotransmitters, astrocytes will also communicate with the nerve terminal by releasing neuromodulatory substances. The increase of glial Ca^{2+} induces the release of glutamate (12) that activates receptors located on the presynaptic terminal (Parpura et al, 1994; Pasti et al, 1997; Bezzi et al., 1998; Araque et al., 1998a,b). NMDA (Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1998a,b) and non-NMDA receptors (Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1998a,b) produce a Ca^{2+} elevation in the presynaptic terminal that increases transmitter release (13) and mGluR receptors decrease transmitter release (14) (Araque et al., 1998a). Glutamate also activates postsynaptic ionotropic receptors (15). B) Astrocyte to astrocyte communication. Calcium waves propagation is driven by the liberation of ATP from astrocytes through Ca^{2+} -dependant mechanism (1). ATP released in the extracellular space causes a Ca^{2+} elevation in adjacent astrocytes (2) which results in the production and the liberation of ATP from that cell which will propagate the Ca^{2+} elevation to the next astrocyte (Guthrie et al., 1999). ATP released may act through adjacent astrocytes by activating ionic P2_x receptors (3) resulting in an influx of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} which depolarises the cell (4) and activates voltage-dependant Ca^{2+} channel (5) (Walz et al., 1994). ATP also activates metabotropic P2_y receptors (6) that stimulate a PLC which results in IP_3 synthesis (7) followed by a Ca^{2+} elevation coming from the liberation of astrocyte internal stores (8) (Fam et al., 2000). It is also possible that IP_3 and other second messengers propagate through gap junctions to the neighbor astrocyte (9) (Giaume and Venance, 1998; Bruzzone and Giaume, 1999).

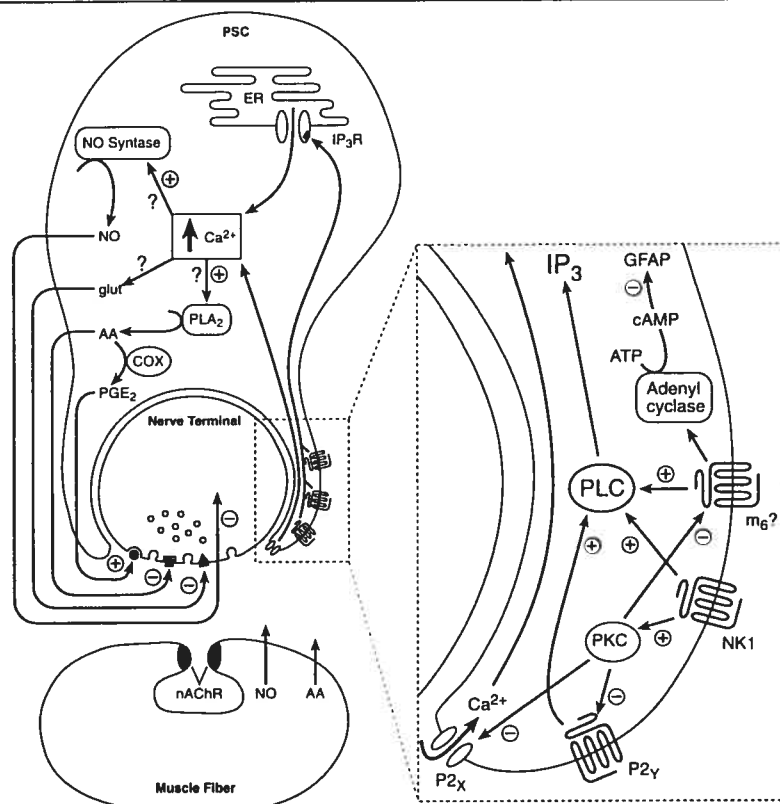
1.7.2.4 Glial production and release of neuroactive substances:

Finally, the glial cell activity and properties change as a consequence of the activation of those receptors and ion channels demonstrating that glial cells adapt to a changing synaptic environment. For example, at the nmj, the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in PSCs is normally suppressed by the activation of muscarinic receptors via a cAMP pathway (Georgiou et al., 1994; 1999). However, upon interruption of transmitter release, the level of GFAP rapidly increases presumably in preparation for the PSCs to elaborate sprouting that will occur later on (Georgiou et al., 1994, 1999). Similar mechanisms are also present in astrocytes of the chick coclear and magnocellular nuclei (Canady and Rubel, 1992; Canady et al., 1994).

Furthermore, activation of glial cell receptors induces the synthesis and release of substances capable of modulating the surrounding cells, including neurons (Figure 2; Villegas, 1981; Szatkowski et al., 1990; Martin, 1992; Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995; Bezzi et al., 1998; Jeftinija and Jeftinija, 1998; Guthrie et al., 1999). Hence, this evidence contributed much to the idea that glial cells not only were responsive to their environment but that they had the potential to modulate neuronal activity in response to neuronal and synaptic activities themselves. This is the basis for the bidirectional interactions between neurons and glial cells (Araque et al., 1999).

A large number of neuroactive substances are released in a Ca^{2+} -dependent fashion which results in a change of the properties of the surrounding neurons. Glutamate is the most studied glial messenger. It is released in a Ca^{2+} -dependent fashion by cultured astrocytes (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998a, b; Bezzi et al., 1998), cultured Schwann cells from dorsal roots ganglia (Parpura et al., 1995; Jeftinija and Jeftinija, 1998) and acutely isolated astrocytes (Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998). ATP is another important glial messenger believed to be responsible for the propagation of Ca^{2+} waves between astrocytes (Guthrie et al., 1999). Prostaglandins, in particular PGE_2 , appears important in mediating glia-neuron interactions since it triggers the release of glutamate by glial cells (Bezziet al., 1998). At the amphibian nmj, synthesizing enzymes for arachidonic acid (AA) and for PGE_2 are present in PSCs and PGE_2 potentiates transmitter release (Pappas et al., 1999). Also, PSCs at denervated amphibian nmjs release ACh spontaneously and upon depolarization (Bevan et al., 1973; Dennis and Miledi, 1974).

Figure 3 *Synapse-glia interactions at the amphibian neuromuscular junction*



Transmitters released (ACh, ATP, SP) by the nerve terminal interact respectively with their muscarinic (m₆?; Robitaille et al., 1997), purinergic (P_{2X}, P_{2Y}; Robitaille, 1995) and neuropeptidic (NK-1; Bourque and Robitaille, 1998) receptors located on PSCs near the synaptic cleft (left). The activation of ionotropic P_{2X} receptors results in a Ca²⁺ influx through a Ca²⁺ permeable ionotropic channel and the metabotropic P_{2Y}, NK-1 and muscarinic receptors activate a phospholipase C and the production of IP₃ and DAG (not shown). IP₃ mobilizes Ca²⁺ from internal stores of the cell by activating an IP₃-dependant channel located on the endoplasmic reticulum. Thus, the final consequence of transmitter release by the nerve terminal on PSCs is an increase of intracellular Ca²⁺. Note that NK-1 receptors also reduce the ability of the purinergic and muscarinic receptors to induce Ca²⁺ responses (Bourque and Robitaille, 1998). Muscarinic metabotropic receptors also activate an adenyl cyclase that results in the production of cAMP that prevents the expression of GFAP (Georgiou et al., 1994, 1999). Ca²⁺ increase in PSCs could activate an NO synthase found in PSCs (Descarries et al., 1998) and the production of NO could depress transmitter release (Lindgren and Laird, 1994; Thomas and Robitaille, 2000). Ca²⁺ increase could also mediate the release of glutamate by PSCs since glutamate was also detected in PSCs and that glutamate also depresses transmitter release (Lévesque et al., 1999). Another possible target for intracellular Ca²⁺ is the phospholipase A₂ (PLA₂) that produces arachidonic acid (AA) or the cyclooxygenase (COX) that transforms AA in prostaglandins (PGE₂), enzymes present in PSCs and it was demonstrated that AA depresses and PGE₂ potentiates transmitter release (Pappas et al., 1999). Although not systematically studied in the context of synapse-glia interactions, muscle fibers can also liberate neuromodulatory substances like NO (Wang et al., 1995) and AA (Harish and Poo, 1992) that could also modulate synaptic transmission.

1.7.3 Glial cells as synaptic partners: evidence and implications

It is only recently that evidence for a glial modulation of synaptic efficacy has been obtained. Using in vitro models of co-cultured neurons and glial cells, it was demonstrated that Ca^{2+} elevation in cultured astrocytes resulted in a modulation of neuronal activity (Charles, 1994; Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994; Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1999) and modulation of synaptic efficacy (Pfrieger and Barres, 1997). As revealed by a rise in intracellular Ca^{2+} , it was shown that the activation of glial cells by a variety of stimuli lead to the modulation of neuronal properties. More recently, work from a few laboratories showed that the modulation of neuronal and synaptic functions by glial cells also occurred in more intact preparations such as hippocampal slices of the rat (Carmignoto et al., 1998; Kang et al., 1998), the rat retina (Newman and Zahs, 1998) and the amphibian nmj (Robitaille, 1998; Castonguay and Robitaille, 2000). In a recent review, Araque et al. (1999) presented the synapse as a tripartite structure that not only includes the presynaptic terminal and the postsynaptic element, but also an active perisynaptic glial element. As proposed by Robitaille (1998; see also Ullian and Barres, 1998), perisynaptic glial cells could now be considered as active partners at chemical synapses.

Interestingly, a number of similarities exist in the different preparations regarding the glial mechanisms involved in the regulation of neuronal and synaptic functions. For instance, the neuronal modulation is the result of a Ca^{2+} -dependent glial production and release of neuro-active substances such as glutamate (Parpura et

al., 1994; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998). Furthermore, the mode of action is relatively slow in comparison to the rate at which phasic synaptic transmission occurs. Hence, the glial regulation involves a long duration of action that outlasts the period of synaptic activity, thus influencing the synaptic properties well beyond the direct interactions that occur during the activation of glial cells.

The synapse-glia interactions appears to be governed by frequency-dependent mechanisms. For instance, at the amphibian nmj, it was demonstrated that larger Ca^{2+} responses were evoked in PSCs by 40Hz nerve stimulation in comparison to 10 or 20 Hz stimulation (Jahromi et al., 1992). Moreover, the inactivation of G proteins in PSCs by GDP β S injection reduced the level of synaptic depression induced by high frequency of stimulation (10 Hz) but had no effect at lower frequency of stimulation (0.2Hz; Robitaille, 1998). The potentiation of G proteins in PSCs by injection of GTP γ S depressed transmitter release and occluded synaptic depression caused by high frequency stimulation (10 Hz; Robitaille, 1998). In hippocampal slices, it was established that astrocytes do not respond to a single neuronal action potential but respond in a graded fashion to the frequency of the presynaptic stimulation (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Araque et al., 1999; Latour et al., 2000).

1.7.4 Heterogeneity of synapse-glia interactions

Although several similarities exist in the mechanisms involved in synapse-glia interactions, a number of differences are also evident. First, the consequence of the

activation of glial cells and, hence, the consequent glial modulation on neurons and synapses will vary according to the types of glial receptors activated. Second, for glial cells to be efficient neuronal and synaptic modulators, it is essential that they are adapted to the neuronal and synaptic environments they are associated with (Keyser and Pellmar, 1997). For instance, glial cells of a brain region with high level of activity (eg, hippocampus) should have different functional properties than glial cells of another region where nerve activity is much lower. This could be identified as “glial macro-domains” where glial cells are specialised for a given region of the brain according to its physiological activity.

1.7.5 Functional glial micro-domains

In addition to the regional differences, there could also be specialisation of glial elements within a given area. Indeed, evidence was obtained by Grosche et al. (1999) in Bergmann glial cells of the cerebellum indicating that synaptic activity elicited by parallel fibre stimulation induced Ca^{2+} responses in restricted areas of the glial cells that corresponded to a morphologically defined structure that the authors called “glial microdomains”. Interestingly, a discreet organization of glial processes has also been suggested for PSCs at the amphibian nmj where L-type Ca^{2+} channels appear clustered in the glial processes at proximity of the transmitter release sites (Robitaille et al., 1996). The evidence for delineated, functional area of glial cell processes lead to the proposition that glial cells possess several functional, independent compartments capable of selective interactions with a given group of

synapses (Grosche et al., 1999). This implies that glial cells are capable of differential regulation of synaptic activity in relation of the synaptic properties. Furthermore, a same glial cell could regulate locally and independently the activity of several synapses simultaneously without necessarily integrating the information provided by all synapses.

1.7.6 Glial cells as functional integrators

Astrocytes in the CNS surround and are responsive to a number of different types of synapses that could be as diverse as glutamatergic, GABAergic, or adrenergic (Figure 2). For instance, in hippocampus, astrocytes are known to be sensitive to glutamate (Bezzi et al., 1998) and GABA (Kang et al., 1998), two groups of synapses that regulate the functional properties of the network in this region. Activation of astrocytes by GABA will lead to a depolarization likely mediated by GABA_A receptors (Kang et al., 1998) while glutamate will activate metabotropic and non-NMDA receptors (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998a, b; Bezzi et al., 1998; Araque et al., 1999). Although there is evidence for the presence of NMDA receptors on astrocytes, this issue remains controversial (Verkhratsky et al., 1998; Latour et al., 2000). Since each neurotransmitter system serves a specific purpose in the neuronal network and since glial cells are sensitive to both of them, one could suggest that glial cells integrate the information conveyed by both synaptic systems in a differential manner according to the different consequences of receptor activation. Not only this would allow glial cells to adapt to a dynamic environment

but, more importantly, allow them to respond to synaptic activity in an integrated manner.

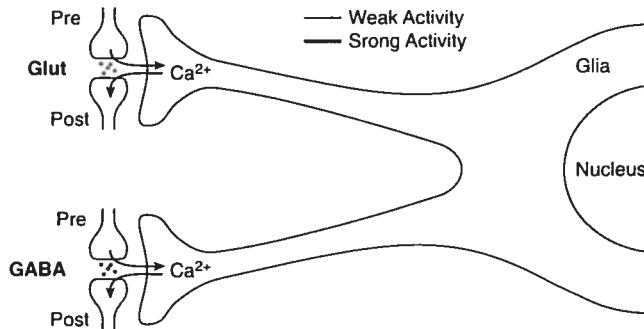
Based on the association of a glial cell with several synapses and their anatomical organization around them, glial cells are exquisitely positioned both morphologically and physiologically to serve as a “Local Network Modulator”. This implies that a same glial cell would modulate in an integrated manner different synapses that it surrounds. In addition, the glial modulation of synaptic transmission and neuronal activity could adjust according to the proportional activity of the neuronal network. Hence, the concept of glial cells as “Local Network Modulator” further implies that glial cells are an integral component of the neural network and are actively involved in shaping the neuronal level of excitability, sculpturing the efficacy and the quality of the transfer of neuronal information.

Based on the concept of microdomains, to perform integrative modulation, glial cells would need to switch from a local and restricted synaptic regulation to a more global mode. We propose a model of a “glial modulatory switch” where changes in the mode of action of glial cells are related to changes in the efficacy and plasticity of the synaptic network they are associated with. To illustrate the model, two processes of a glial cell are associated with different synapses, one with a glutamatergic synapse and the other with a GABAergic synapse (Figure 4). We propose that perisynaptic glial cells will function in a local modulatory mode when the synapses they are associated with have a low level of synaptic activity (Figure 4A). Hence, in this configuration, the glial modulation of the glutamatergic and the GABAergic synapse would be independent of one another and only regulated by their respective synaptic activity. However, upon changes in synaptic efficacy, the

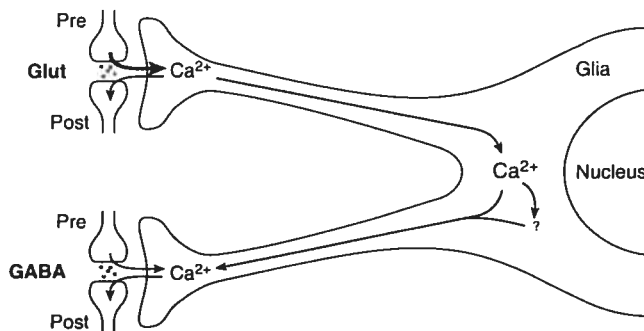
increased activity at one synapse would induce a larger modulation of the glial cell that would result in a full glial activation and in a regulation of the distant GABAergic synapse (Figure 4B). An interesting possibility might be that a larger and more prolonged elevation of Ca^{2+} could now spread beyond the micro-domain and invade the whole glial cell. In this configuration, one would predict that the excitatory and inhibitory balance in the network would be challenged. Furthermore, glial cells could also be globally influenced by both sets of synapses which would result in an integrated glial modulation of the glutamatergic and GABAergic synapses (Figure 4C). Hence, this “glial modulatory switch” would be an efficient and selective mechanism by which glial cells could adapt to the synaptic environment and modify their impact on synaptic activity according to the synaptic efficacy, not only locally but also in the neuronal network. This implies that glial cells, similarly to neurons, could also express synaptic plasticity in response to changes in synaptic activity (Shao and McCarthy, 1994).

Figure 4 *Glial cells as “Local Networks Integrators”*

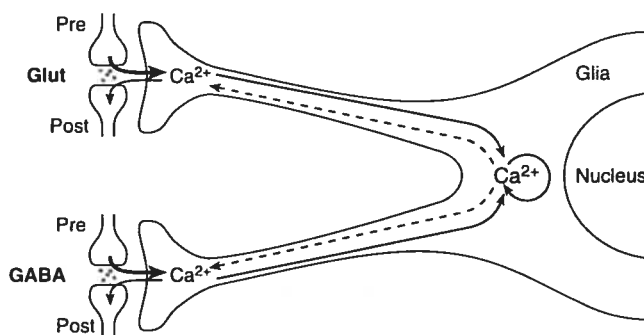
A Local And Restricted Synapse-Glia Interactions



B Non - Integrated Extended Synapse-Glia Interactions



C Integrated Synapse-Glia Interactions



(A) The local and restricted synapse-glia interactions condition implicates that both synapses (for example glutamatergic and GABAergic) present a weak synaptic activity. The synaptic activity of both synapses will induce a small and localized Ca^{2+} increase in their respective glial processes elaborated by the same perisynaptic astrocyte. In this model, the weak activity of both synapses would not be strong enough to induce modifications in the whole glial cell. Thus, synapse-glia interactions would be localised and restricted to each synapse. In fact, in this condition, the glial activity at one synapse could not influence the activity at the other synapse ensheathed by the same perisynaptic astrocyte. (B) The non-integrated extended synapse-glia interactions condition involves a strong activity at one synapse (for example the glutamatergic) leading to a higher increase of Ca^{2+} in the glial cell that would spread to the entire astrocyte processes associated with this synapse. The weaker activity at the other synapse (GABAergic) will only induce a small Ca^{2+} increase in its local glial cell processes. Thus, the higher increase of glial Ca^{2+} at the strong synapse would induce a general modification, and influence not only the strong synapse but also the glial response to synaptic activity at the weak synapse. Note that the

glial modification induced by the strong activity at one synapse could be related to the influence of high glial cytoplasmic free- Ca^{2+} concentration which could lead to protein phosphorylation, to up- or down-regulation of glial receptors, synthesis of glial second messenger, etc. This glial plasticity could then influence the weak synapse connected by the same glial cell. (C) The integrated synaptic-glia interactions condition implicates that both synapses (glutamatergic and GABAergic) express a strong activity. The strong Ca^{2+} increase in both glial processes could induce a glial modification where both synapses could influence the activity of the other. In this condition, the astrocyte would integrate the information received from each synapse and modulate them in an integrated fashion.

1.7.7 Do glial cells convey parallel processing?

The evidence that Ca^{2+} waves propagate from a glial cell to its neighbours over several hundred of microns (Cornell-Bell et al., 1990; Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991) prompted the proposition that glial cells were capable of carrying information in parallel of the neuronal network (Smith, 1992). For the most part, evidence of Ca^{2+} waves in astrocytes were obtained in cultures. However, evidence also demonstrates the presence of waves in acute preparations such as the retina (Newman and Zahs, 1998) and in hippocampal slices (Pasti et al., 1997). The propagation of the waves appears dependent upon the release of ATP by astrocytes (Guthrie et al., 1999) as well as the permeation of gap junctions between astrocytes to Ca^{2+} and IP_3 (Giaume and Venance, 1998; Bruzzone and Giaume, 1999). These would extend over a larger area, according to the extent of the glial syncytium (D'Ambrosio et al., 1998), the regulation triggered by the activity of a more limited number of neurons and synapses. Hence, owing to the syncytial network, astrocytes would not only contribute to the local activity but also modify neuronal and synaptic properties at a distance from the synaptic activity responsible for the initiation of the waves.

The major repercussion of this parallel transfer of information is that neurons and synapses might be modulated as a consequence of neuronal activity that appears irrelevant on a neuronal basis. Hence, one may question the applicability and the appropriateness of such a parallel network. For instance, is it pertinent for neurons and synapses to be modulated according to the activity of synapses with which they

have no neuronal connection? Furthermore, because the propagation of the information through the glial network is much slower than in the neuronal network (see Smith, 1992), the glial modulation of the neuronal functions would apply to events that are occurring later than the event that initiated the glial Ca^{2+} waves. Hence, on the basis of the determined, rapid, directional neuronal transfer of information, such a glial parallel network of information may appear unpractical. However, the time course of the glial modulation compares quite well with other slow mechanisms such as hormonal and humoral regulation that have important consequences on the properties of neurons. Moreover, the glial network may be quite important in maintaining the basal level of excitability of a neuronal circuit, shaping its properties in an integrated fashion. Perhaps, the purpose of the glial network is to maintain the neuronal network in a functional state that is adjusted from the previous experience of the glial and neuronal networks.

1.7.8 Conclusions

In this chapter we presented evidence that perisynaptic glial cells are active excitable cells involved in dynamic bidirectional interactions with neurons and synapses. For the most part, the evidence so far accumulated indicates that glial cells are involved in dynamic interactions with synapses suggesting that they are an active component of the synapse. However, little is known about the implications of such an involvement of glial cells in the most basic phenomenon in the nervous system, that is, the transfer of information by chemical synapses. Hence, this chapter also

raised a number of possibilities that are obviously hypothetical and remain to be proven but, nonetheless, present the challenging questions that are to be answered in the future.

1.7.9 Acknowledgements

We want to express our thanks to Mr. Claude Gauthier for the preparation of the figures. This work was supported by a grant from the Medical Research of Council of Canada (MT-14137), a grant from the Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR; ER-2119), a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (203729-99) and from the EJLB Foundation to RR. AC was supported by an FRSQ/FCAR Santé studentship and by an MRC studentship, SL was supported by a FRSQ/FCAR Santé studentship and RR was supported by awards from FRSQ Junior II scholar and an MRC Scientist scholar.

1.7.10 References

- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P. and Haydon, P.G. (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 10: 2129-2142.
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V. and Haydon, P.G. (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 18: 6822-6829.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P. and Haydon, P.G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.*, 22: 208-215.
- Attwell, D. (1994) Glia and neurons in dialogue. *Nature*, 369: 707-708.
- Barres, B.A., Chun, L.L. and Corey, D.P. (1989) Glial and neuronal forms of the voltage-dependant sodium channel: characteristics and cell-type distribution. *Neuron*, 2: 1375-1388.
- Barres, B.A., Chun, L.L. and Corey, D.P. (1990) Ion channels in vertebrate glia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 13: 441-474.
- Bekar, L.K. and Walz, W. (1999) Evidence for chloride ions as intracellular messenger substances in astrocytes. *J. Neurophysiol.*, 82: 248-254.
- Bevan, S., Miledi, R. and Grampp, W. (1973) Induced transmitter release from Schwann cells and its suppression by actinomycin D. *Nat. New Biol.*, 241: 85-86.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T. and Volterra, A. (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, 391: 281-285.
- Bourque, M.J. and Robitaille, R. (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 512.1: 197-209.
- Bruzzone, R. and Giaume, C. (1999) Connexins and information transfer through glia. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 468: 321-337.
- Canady, K.S. and Rubel, E.W. (1992) Rapid and reversible astrocytic reaction to afferent activity blockade in chick cochlear nucleus. *J. Neurosci.*, 12: 1001-1009.

- Canady, K.S., Hyson, R.L. and Rubel, E.W. (1994) The astrocytic response to afferent activity blockade in chick nucleus magnocellularis is independent of synaptic activation, age, and neuronal survival. *J. Neurosci.*, 14: 5973-5985.
- Carmignoto, G., Pasti, L. and Pozzan, T. (1998) On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes *in situ*. *J. Neurosci.*, 18: 4637-4645.
- Castonguay, A. and Robitaille, R. (2000) Ca^{2+} elevation in perisynaptic Schwann cells modulates synaptic transmission at the vertebrate neuromuscular synapse. *Revista de Neurologia*, IV European Meeting on Glial cell Function in Health and Disease, Barcelona, Castellano, B. and Nieto-Sampedro, M. Eds.. p 80.
- Charles, A.C. (1994) Glia-neuron intercellular calcium signaling. *Dev. Neurosci.*, 16: 196-206.
- Chiu, S.Y. (1991) Functions and distribution of voltage-gated sodium and potassium channels in mammalian Schwann cells. *Glia*, 4: 541-558.
- Chiu, S.Y. and Kriegler, S. (1994) Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. *Glia*, 11: 191-200.
- Cornell-bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, S.M. and Smith, S.J. (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247: 470-473.
- Cornell-Bell, A.H. and Finkbeiner, S.M. (1991) Ca^{2+} waves in astrocytes. *Cell Calcium*, 12:185-204.
- D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P.A., McKhann II, G.M. and Janigro, D. (1998) Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.*, 18: 4425-4438.
- Dani, J.W., Chernjavsky, A. and Smith, S.J. (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron*, 8: 429-440.
- Deitmer, J.W. and Rose, C.R. (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog. Neurobiol.*, 48: 73-103.
- Dennis, M.J. and Miledi, R. (1974) Electrically induced release of acetylcholine from denervated Schwann cells. *J. Physiol. (Lond)*, 237: 431-452.
- Descarries, L.M., Cai, S. and Robitaille, R. (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, 27: 827-838.
- Duffy, S. and MacVicar, B.A. (1994) Potassium-dependent calcium influx in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Neuroscience*, 61: 51-61.

Duffy, S. and MacVicar, B.A. (1995) Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J. Neurosci.*, 15: 5535-5550.

Fam, S.R., Gallagher, C.J. and Salter, M.W. (2000) P_{2Y1} purinoceptor-mediated Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. *J. Neurosci.*, 20: 2800-2808.

Finkbeiner, S.M. (1993) Glial calcium. *Glial*, 9: 83-104.

Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W.S. and Charlton, M.P. (1994) Synaptic regulation of glial protein expression In Vivo. *Neuron*, 12: 443-455.

Georgiou, J., Robitaille, R. and Charlton, M.P. (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J. Neurosci.*, 19: 3836-3846.

Giaume, C. and Venance, L. (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, 24: 50-64.

Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A. and Kettenmann, H. (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat. Neurosci.*, 2: 139-143.

Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V.L., Charles, A.C. and Kater, S.B. (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.*, 19: 520-528.

Hansson, E. and Ronnback, L. (1990) Astrocytes in neurotransmission. A review. *Cell. Mol. Biol.*, 36: 487-496.

Harish, O.E. and Poo, M.M. (1992) Retrograde modulation at developing neuromuscular synapses: involvement of G protein and arachidonic acid cascade. *Neuron*, 9: 1201-1209.

Hassinger, T.D., Atkinson, P.B., Strecker, G.J., Whalen, L.R., Dudek, F.E., Kossel, A.H. and Kater, S.B. (1995) Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J. Neurobiol.*, 28: 159-170.

Jahromi, B.S., Robitaille, R. and Charlton, M.P. (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*, 8: 1069-1077.

Jeftinija, S.D. and Jeftinija, K.V. (1998) ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cells. *Neuroscience*, 82: 927-934.

Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A. and Nedergaard, M. (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.*, 1: 683-692.

- Kettenmann, H. and Ransom, B.R. eds, (1995) *Neuroglia*, Oxford University Press.
- Keyser, D.O. and Pellmar, T.C. (1997) Regional differences in glial cell modulation of synaptic transmission. *Hippocampus*, 7: 73-77.
- Kimelberg, H.K. (1995) Receptors on astrocytes - what possible functions? *Neurochem. Int.*, 26: 27-40.
- Kuffler, S.W., Nicholls, J.G. and Orkand, R.K. (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.*, 29: 768-787.
- Latour, I., Gee, C.E., Robitaille, R. and Lacaille, J.-C. (2000) Differential mechanisms of Ca^{2+} responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. Submitted to *Hippocampus*.
- Lévesque, S., Hazrati, L.-N. and Robitaille, R. (1999) Glutamate as a potential glial messenger at the amphibian neuromuscular junction. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 25: 502.16.
- Lindgren, C.A. and Laird, M.V. (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport*, 5: 2205-2208.
- MacVicar, B.A., Hochman, D., Delay, M.J. and Weiss, S. (1991) Modulation of intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by influx through voltage-activated Ca^{2+} channels. *Glia*, 4: 448-455.
- Martin, D.L. (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia*, 5: 81-94.
- Mennerick, S. and Zorumski, C.F. (1994) Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature*, 368: 59-62.
- Nedergaard, M. (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*, 263: 1768-1771.
- Newman, E.A. (1984) Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature*, 309: 155-157.
- Newman, E.A. and Reichenbach, A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.*, 19: 307-312.
- Newman, E.A. and Zahs, K.R. (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J. Neurosci.*, 18: 4022-4028.
- Orkand, R.K., Nicholls, J.G. and Kuffler, S.W. (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurobiol.*, 29: 788-806.

Pappas, D., Hazrati, L.-N. and Robitaille, R. (1999) Arachidonic acid and PGE₂ as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. Soc. Neurosci. Abstr., 25: 502.17.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S. and Haydon, P.G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. Nature, 369: 744-747.

Parpura, V., Liu, F., Jeftinija, K.V., Haydon, P.G. and Jeftinija, S.D. (1995) Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann cells. J. Neurosci., 15: 5831-5839.

Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T. and Carmignoto, G. (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *In Situ*. J. Neurosci., 17: 7817-7830.

Pfriege, F.W. and Barres, B.A. (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. Science, 277: 1684-1687.

Porter, J.T. and McCarthy, K.D. (1996) Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. J. Neurosci., 16: 5073-5081.

Porter, J.T. and McCarthy, K.D. (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. Prog. Neurobiol., 51: 439-455.

Reist, N.E. and Smith, S.J. (1992) Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 7625-7629.

Robert, A. and Magistretti, P.J. (1997) AMPA/kainate receptor activation blocks K⁺ currents via internal Na⁺ increase in mouse cultured stellate astrocytes. Glia, 20: 38-50.

Robitaille, R. (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. J. Neurosci., 15: 7121-7131.

Robitaille, R. (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. Neuron, 21: 847-855.

Robitaille, R., Bourque, M.J. and Vandaele, S. (1996) Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. J. Neurosci., 16: 148-158.

Robitaille, R., Jahromi, B.S. and Charlton, M.P. (1997) Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond), 504.2: 337-347.

Rochon, D. and Robitaille, R. (1999) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 25: 502.15.

Schaller, K.L., Krzemien, D.M., Yarowsky, P.J. Krueger, B.K. and Caldwell J.H. (1995) A novel, abundant sodium channel expressed in neurons and glia. *J. Neurosci.*, 15: 3231-3242.

Schools, G.P. and Kimelberg, H.K. (1999) mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J. Neurosci. Res.*, 58: 533-543.

Shao, Y. and McCarthy, K.D. (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia*, 11: 147-155.

Shao, Y. and McCarthy, K.D. (1995) Receptor-mediated calcium signals in astroglia: multiple receptors, common stores and all-or-nothing responses. *Cell Calcium*, 17: 187-196.

Smith, S.J. (1992) Do astrocytes process neural information? In: *Prog. Brain Res.*, Yu, A.C.H., Hertz, L., Norenberg, M.D., Syková, E. and Waxman, S.G. Waxman eds, Elsevier Science Publishers, vol. 94, pp. 119-136.

Smith, S.J. (1994) Neural signalling. Neuromodulatory astrocytes. *Curr. Biol.*, 4: 807-810.

Sneyd, J., Charles, A.C. and Sanderson, M.J. (1994) A model for the propagation of intercellular calcium waves. *Am. J. Physiol.*, 266:C293-302.

Sontheimer, H. (1994) Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia*, 11: 156-172.

Szatkowski, M., Barbour, B. and Attwell, D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, 348: 443-446.

Thomas, S. and Robitaille, R. (2000) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. Submitted to *J. Neurosci.*

Ullian, E.M. and Barres, B.A. (1998) The Schwann song of the glia-less synapse. *Neuron*, 21: 651-652.

Ventura, R. and Harris, K.M. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.*, 19: 6897-6906.

Verkhratsky, A., Orkand, R.K. and Kettenmann, H. (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.*, 78: 99-141.

Verkhratsky, A. and Steinhäuser, C. (2000) Ion channels in glial cells. *Brain. Res. Rev.*, 32: 380-412.

Vernadakis, A. (1996) Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog. Neurobiol.*, 49: 185-214.

Villegas, J. (1981) Axon/Schwann-cell relationships in the giant nerve fibre of the squid. *J. Exp. Biol.*, 95: 135-151.

Walz, W., Gimpl, G., Ohlemeyer, C., Kettenmann, H. (1994) Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *J. Neurosci. Res.*, 38: 12-18.

Wang, T., Xie, Z. and Lu, B. (1995) Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature*, 374: 262-266.

1.7.11 List of abbreviations

AA :	arachidonic acid
ACh :	acetylcholine
AMPA:	acide a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionique
ATP:	adenosine triphosphate
BK:	bradykinin
CGRP:	calcitonin gene related peptide
COX:	cyclooxygenase
CNS:	central nervous system
DAG:	diacylglycerol
E:	epinephrine
IP ₃ :	inositol-1,4,5-trisphosphate
GABA:	gamma-aminobutyric acid
GFAP:	glial fibrillary acidic protein
mGluR:	metabotropic glutamate receptor
nAChR:	nicotinic cholinergic receptor
NE:	norepinephrine
NMDA:	N-methyl-D-Aspartate
nmj:	neuromuscular junction
NO:	nitric oxide
NPY:	neuropeptide Y
PGE ₂ :	prostaglandin E ₂
PiP ₂ :	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC:	protein kinase C
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
PLC:	phospholipase C
PNS:	peripheral nervous system
PSCs:	perisynaptic Schwann cells
ER:	endoplasmic reticulum
SP:	substance P
SV:	synaptic vesicle

1.8 Retour sur l'article de revue

Au moment de sa parution, cet article mettait de l'avant plusieurs hypothèses quant aux relations fonctionnelles et aux modes de communication neurone – glie – neurone. Des articles parus plus récemment ont ajouté à notre compréhension de ces interactions complexes entre les neurones et les cellules gliales, assurant une bonne communication entre ces deux types cellulaires.

Ainsi, il a été montré que les astrocytes en cultures provenant d'hippocampes de rats libéraient du glutamate de façon Ca^{2+} -dépendante grâce aux protéines du complexe SNARE d'exocytose (Araque et al., 2000). De même, au niveau d'astrocytes fraîchement isolés et in situ, ce groupe a montré que les astrocytes possèdent la machinerie cellulaire pour stocker le glutamate dans des vésicules et que la relâche de ce NT se fait par un système de fusion vésiculaire (Zhang et al., 2004). La présence de vésicules astrocytaires, rassemblées près de la membrane cellulaire faisant face à des récepteurs glutamatergiques, a été confirmée par des marquages immunogold (Bezzi et al., 2004). Ce mode de fonctionnement de la relâche glutamatergique astrocytaire laisse supposer une importante régulation de ce mécanisme, qui n'était pas soupçonnée jusqu'à ce jour et que l'on croyait être à l'usage exclusif des neurones.

D'autre part, la propagation d'une vague calcique pourrait effectivement servir à modifier les propriétés membranaires d'un groupe de neurones grâce à la libération de glutamate Ca^{2+} -dépendante. En effet, en agissant sur des récepteurs

NMDA extrasynaptiques, la libération de glutamate astrocytaire au niveau des neurones de la région CA1 de l'hippocampe peut causer des courants entrants synchrones dans plusieurs neurones en même temps (Fellin et al., 2004). Ainsi, il est possible que lors d'une période d'activité neuronale intense, les astrocytes activés puissent agir en retour sur plusieurs neurones simultanément pour en synchroniser l'activité.

1.9 But de la thèse

Mon projet de doctorat porte sur la participation des cellules gliales dans la modulation de l'activité synaptique et des phénomènes de plasticité à la JNM. Plus particulièrement, nous avons étudié les effets des élévations calciques des cellules gliales pérисynaptiques au niveau de la transmission synaptique. Pour ce faire, nous avons utilisé la préparation de JNM de grenouille (*Rana pipiens*) *in situ*. Cette préparation est facilement accessible pour les enregistrements électrophysiologiques et l'imagerie calcique et l'on y retrouve les formes de plasticité synaptique décrites précédemment.

1.9.1 Objectifs

- 1) Établir si l'activation du métabolisme des CSPs, mis en évidence par une élévation de leur $[Ca^{2+}]_i$ entraîne une modulation de la transmission synaptique à la JNM de grenouille
- 2) Comprendre comment s'effectue le contrôle de la relâche du Ca^{2+} des réserves calciques gliales
- 3) Voir s'il existe une modulation différentielle de la TS par les CSPs en fonction de la magnitude des élévations calciques intracellulaires rencontrées au niveau des CSPs.

Le corps de cette thèse comportera trois principaux chapitres :

Chapitre deuxième : Modulation de la transmission synaptique par les élévations calciques présynaptiques et gliales à la jonction neuromusculaire. Article : « Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca^{2+} internal stores at the neuromuscular synapse ». J. Neurosci. 21(6) : 1911-1922, 2001.

Chapitre troisième : La Xestospongine C, un inhibiteur du récepteur à l' IP_3 , interagit avec le fonctionnement de la pompe Ca^{2+} -ATPase des réserves calciques de la JNM d'amphibien *in situ*. Article : « Xestospongine C is a potent inhibitor of SERCA at a vertebrate synapse ». Cell Calcium 32(1) : 39-47, 2002.

Chapitre quatrième : Modulation de la transmission synaptique par différents schèmes d'élévations calciques gliales induites par la photolyse de Ca^{2+} encagé, à la JNM d'amphibien.

1.10 Références de l'introduction

- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14.
- Apparsundaram S (2001) Function and regulation of monoamine transporters: focus on the norepinephrine transporter. *CNS Spectr* 6: 671-678.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20: 666-673.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22: 2443-2450.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10: 2129-2142.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* 18: 6822-6829.
- Atluri PP, Regehr WG (1998) Delayed release of neurotransmitter from cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18: 8214-8227.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40: 389-400.
- Ballanyi K, Grafe P, ten Bruggencate G (1987) Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. *J Physiol (Lond)* 382: 159-174.
- Baranska J, Przybylek K, Sabala P (1999) Capacitative calcium entry. Glioma C6 as a model of nonexcitable cells. *Pol J Pharmacol* 51: 153-162.
- Barker LA, Dowdall MJ, Whittaker VP (1972) Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine. *Biochem J* 130: 1063-1075.
- Barrett EF, Stevens CF (1972) The kinetics of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* 227: 691-708.
- Bergles DE, Jahr CE (1997) Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19: 1297-1308.

- Bergles DE, Jahr CE (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18: 7709-7716.
- Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155.
- Bertil Hille (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Massachussetts: Sinauer Associates inc.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4: 702-710.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7: 613-620.
- Blakely RD, Bauman AL (2000) Biogenic amine transporters: regulation in flux. *Curr Opin Neurobiol* 10: 328-336.
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79: 763-854.
- Boitier E, Rea R, Duchen MR (1999) Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca $^{2+}$ waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol* 145: 795-808.
- Bordey A, Sontheimer H (2000) Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* 30: 27-38.
- Bordey A, Sontheimer H (2003) Modulation of glutamatergic transmission by bergmann glial cells in rat cerebellum in situ. *J Neurophysiol* 89: 979-988.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 512 (Pt 1): 197-209.
- Brain KL, Bennett MR (1995) Calcium in the nerve terminals of chick ciliary ganglia during facilitation, augmentation and potentiation. *J Physiol* 489 (Pt 3): 637-648.
- Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256: 1021-1025.
- Brunder DG, Gyorke S, Dettbarn C, Palade P (1992) Involvement of sarcoplasmic reticulum 'Ca $^{2+}$ release channels' in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle. *J Physiol* 445: 759-778.

- Bunge RP (1994) The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J Neurol* 242: S19-S21.
- Burnstock G (1996) P2 purinoceptors: historical perspective and classification. *Ciba Foundation Symposium* 198: 1-34.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 22: 73-86.
- Butt AM, Duncan A, Berry M (1994) Astrocyte associations with nodes of Ranvier: ultrastructural analysis of HRP-filled astrocytes in the mouse optic nerve. *J Neurocytol* 23: 486-499.
- Carmant L, Woodhall G, Ouardouz M, Robitaille R, Lacaille JC (1997) Interneuron-specific Ca^{2+} responses linked to metabotropic and ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 9: 1625-1635.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57: 499-524.
- Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 498-508.
- Charles A (1998) Intercellular calcium waves in glia. *Glia* 24: 39-49.
- Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV, Bassan M, DeSilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg PA (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 1136-1148.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247: 470-473.
- Couteaux R, Pécot-Dechavassine M (1974) Les zones specialisees des membranes presynaptiques. *C R Acad Sc Paris* 278: 291-293.
- David G, Barrett JN, Barrett EF (1998) Evidence that mitochondria buffer physiological Ca^{2+} loads in lizard motor nerve terminals. *J Physiol* 509 (Pt 1): 59-65.
- David G, Barrett EF (2003) Mitochondrial Ca^{2+} uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol (Lond)* 548: 425.
- Del Castillo J, Katz B (1954) Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *Journal of Physiology* 124: 574-585.

- Del Castillo, J, Stark, L. (1952) The effects of calcium ions on the motor end-plate potential. *J. Physiol.* 116, 507-515. 1952.
- Delaney KR, Zucker RS (1990) Calcium released by photolysis of DM-nitrophen stimulates transmitter release at squid giant synapse. *J Physiol (London)* 426: 473-498.
- Delaney KR, Zucker RS, Tank DW (1989) Calcium in motor nerve terminals associated with posttetanic potentiation. *J Neurosci* 9(10): 3558-3567.
- Doris PA (1994) Regulation of Na,K-ATPase by endogenous ouabain-like materials. *Proc Soc Exp Biol Med* 205: 202-212.
- Dudel J, Kuffler SW (1961) Mechanism of facilitation at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol* 155: 530-542.
- Engelman HS, Macdermott AB (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* 5: 135-145.
- Enkvist MO, Holopainen I, Akerman KE (1989) Glutamate receptor-linked changes in membrane potential and intracellular Ca^{2+} in primary rat astrocytes. *Glia* 2: 397-402.
- Enkvist MO, McCarthy KD (1992) Activation of protein kinase C blocks astroglial gap junction communication and inhibits the spread of calcium waves. *J Neurochem* 59: 519-526.
- Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* 117: 109-128.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43: 729-743.
- Fisher SA, Fischer TM, Carew TJ (1997) Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *Trends Neurosci* 20: 170-177.
- Garaschuk O, Yaari Y, Konnerth A (1997) Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 502 (Pt 1): 13-30.
- Georgiou J, Charlton MP (1999) Non-myelin-forming perisynaptic Schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia* 27: 101-109.
- Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19: 3836-3846.

- Goda Y, Stevens CF (1994) Two components of transmitter release at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12942-12946.
- Golovina VK, Blaustein MP (2000) Unloading and refilling of two classes of spatially resolved endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores in astrocytes. *Glia* 31: 15-28.
- Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV, Mayr GW (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398: 70-73.
- Hagler DJ, Jr., Goda Y (2001) Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 85: 2324-2334.
- Harlow ML, Ress D, Stoschek A, Marshall RM, McMahan UJ (2001) The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* 409: 479-484.
- Hassinger TD, Atkinson PB, Strecker GJ, Whalen LR, Dudek FE, Kossel AH, Kater SB (1995) Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J Neurobiol* 28: 159-170.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2: 185-193.
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Cell Biology* 57: 315-344.
- Hirose K, Kadowaki S, Iino M (1998) Allosteric regulation by cytoplasmic Ca^{2+} and IP_3 of the gating of IP_3 receptors in permeabilized guinea-pig vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 506 (Pt 2): 407-414.
- Horisberger JD (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)* 19: 377-387.
- Hsu SC, Hazuka CD, Foletti DL, Scheller RH (1999) Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol* 9: 150-153.
- Hsu SC, Ting AE, Hazuka CD, Davanger S, Kenny JW, Kee Y, Scheller RH (1996) The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* 17: 1209-1219.
- Huang H, Bordey A (2004) Glial glutamate transporters limit spillover activation of presynaptic NMDA receptors and influence synaptic inhibition of Purkinje neurons. *J Neurosci* 24: 5659-5669.

- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8: 1069-1077.
- Jayaraman T, Ondrias K, Ondriasova E, Marks AR (1996) Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* 272: 1492-1494.
- John LM, Lechleiter JD, Camacho P (1998) Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol* 142: 963-973.
- Joux N, Chevaleyre V, Alonso G, Boissin-Agasse L, Moos FC, Desarmenien MG, Hussy N (2001) High voltage-activated Ca^{2+} currents in rat supraoptic neurones: biophysical properties and expression of the various channel α 1 subunits. *J Neuroendocrinol* 13: 638-649.
- Kamiya H, Zucker RS (1994) Residual Ca^{2+} and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371: 603-606X.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195: 481-492.
- Khodakhah K, Armstrong CM (1997) Inositol trisphosphate and ryanodine receptors share a common functional Ca^{2+} pool in cerebellar Purkinje neurons. *Biophys J* 73: 3349-3357.
- Kimelberg HK (1995) Receptors on astrocytes - what possible functions? *Neurochem Int* 26: 27-40.
- Kimura M, Saitoh N, Takahashi T (2003) Adenosine $\text{A}(1)$ receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *J Physiol* 553: 415-426.
- Kojima S, Nakamura T, Nidaira T, Nakamura K, Ooashi N, Ito E, Watase K, Tanaka K, Wada K, Kudo Y, Miyakawa H (1999) Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices. *J Neurosci* 19: 2580-2588.
- Kreitzer AC, Regehr WG (2000) Modulation of transmission during trains at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 20: 1348-1357.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29: 768-787.
- Kumakura K, Sasaki K, Sakurai T, Ohara-Imaizumi M, Misonou H, Nakamura S, Matsuda Y, Nonomura Y (1994) Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP -dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 14: 7695-7703.

- Kuromi H, Kidokoro Y (2003) Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32: 551-565.
- Li Y, Camacho P (2004) Ca^{2+} -dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol* 164: 35-46.
- Lin RC, Scheller RH (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 19-49.
- Magleby KL, Zengel JE (1976) Augmentation: a process that acts to increase transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* 257: 449-470.
- Marcaggi P, Billups D, Attwell D (2003) The role of glial glutamate transporters in maintaining the independent operation of juvenile mouse cerebellar parallel fibre synapses. *J Physiol* 552: 89-107.
- Martini R, Schachner M (1997) Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19: 298-310.
- McPherson PS, Campbell KP (1993) The ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 13765-13768.
- Mei YA, Le Foll F, Vaudry H, Cazin L (1996) Adenosine inhibits L- and N- type calcium channels in pituitary melanotrophs. Evidence for the involvement of a G protein in calcium channel gating. *Journal of Neuroendocrinology* 8: 85-91.
- Mikoshiba K (1997) The InsP_3 receptor and intracellular Ca^{2+} signaling. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 339-345.
- Mikoshiba K, Furuichi T, Miyawaki A (1994) Structure and function of IP_3 receptors. *Semin Cell Biol* 5: 273-281.
- Mochida S, Kobayashi H, Matsuda Y, Yuda Y, Muramoto K, Nonomura Y (1994) Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* 13: 1131-1142.
- Mulligan SJ, Macvicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431: 195-199.
- Mynlieff M, Beam KG (1994) Adenosine acting at an A_1 receptor decreases N-type calcium current in mouse motoneurons. *Journal of Neuroscience* 14: 3628-3634.
- Narita K, Akita t, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K (1998) A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism involved in asynchronous exocytosis at frog motor nerve terminals. *J Gen Physiol* 112: 593-609.

- Newman EA (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26: 536-542.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225: 1174-1175.
- Newman EA, Zahs KR (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 275: 844-847.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18: 4022-4028.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29: 788-806.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54: 581-618.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17: 7817-7830.
- Patel S, Joseph SK, Thomas AP (1999) Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 25: 247-264.
- Peper K, Dreyer F, Sandri C, Akert K, Moor H (1974) Structure and ultrastructure of the frog motor endplate. A freeze- etching study. *Cell Tissue Res* 149: 437-455.
- Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117-161.
- Pessah IN, Waterhouse AL, Casida JE (1985) The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 449-456.
- Pieribone VA, Shupliakov O, Brodin L, Hilfiker-Rothenfluh S, Czernik AJ, Greengard P (1995) Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375: 493-497.
- Pinard A, Levesque S, Vallee J, Robitaille R (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci* 18: 3241-3250.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51: 439-455.

- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO (2001) Neuroscience. Sunderland (MA), Sinauer Associates, Inc.
- Putney JW, Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12.
- Qian SM, Delaney KR (1997) Neuromodulation of activity-dependent synaptic enhancement at crayfish neuromuscular junction. *Brain Res* 771: 259-270.
- Radian R, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Castel M, Kanner BI (1990) Immunocytochemical localization of the GABA transporter in rat brain. *J Neurosci* 10: 1319-1330.
- Ravin R, Spira ME, Parnas H, Parnas I (1997) Simultaneous measurement of intracellular Ca^{2+} and asynchronous transmitter release from the same crayfish bouton. *J Physiol* 501 (Pt 2): 251-262.
- Regehr WG, Delaney KR, Tank DW (1994) The role of presynaptic calcium in short-term enhancement at the hippocampal mossy fiber synapse. *J Neurosci* 14(2): 523-537.
- Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO, Betz WJ (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 39: 529-541.
- Rickman C, Davletov B (2003) Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs. *J Biol Chem* 278: 5501-5504.
- Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15: 7121-7131.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21: 847-855.
- Robitaille R, Adler EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5: 1-10.
- Robitaille R, Charlton MP (1992) Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* 12: 297-305.
- Robitaille R, Thomas S, Charlton MP (1999) Effects of adenosine on Ca^{2+} entry in the nerve terminal of the frog neuromuscular junction. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 707-714.
- Rochon D, Rousse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21: 3819-3829.

- Ryan TA (1999) Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing. *J Neurosci* 19: 1317-1323.
- Sabatini BL, Regehr WG (1996) Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* 384: 170-172.
- Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2002) Graded contribution of the Gbeta gamma binding domains to GIRK channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10783-10788.
- Sanmarti-Vila L, tom DS, Richter K, Altrock W, Zhang L, Volkhardt W, Zimmermann H, Garner CC, Gundelfinger ED, Dresbach T (2000) Membrane association of presynaptic cytomatrix protein bassoon. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 43-46.
- Sommer L, Suter U (1998) The glycoprotein P0 in peripheral gliogenesis. *Cell and Tissue Research* 292: 11-16.
- Spacek J (1971) Three-dimensional reconstructions of astroglia and oligodendroglia cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 112: 430-442.
- Stevens CF, Wesseling JF (1999) Augmentation is a potentiation of the exocytotic process. *Neuron* 22: 139-146.
- Sudhof TC (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28: 317-320.
- Sugino H, Ogura A, Kudo Y, Amano T (1984) Intracellular Ca^{2+} elevation induced by a neurotransmitter in a glial cell clone. *Brain Res* 322: 127-130.
- Supattapone S, Worley PF, Baraban JM, Snyder SH (1988) Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 263: 1530-1534.
- Suzuki S, Osanai M, Murase M, Suzuki N, Ito K, Shirasaki T, Narita K, Ohnuma K, Kuba K, Kijima H (2000) Ca^{2+} dynamics at the frog motor nerve terminal. *Pflugers Arch* 440: 351-365.
- Tanabe N, Morota A, Kijima H (1995) Effects of Mg^{2+} on the stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Zoolog Sci* 12: 265-270.
- Tang Y, Zucker RS (1997) Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron* 18: 483-491.
- Thomas S, Robitaille R (2001) Differential Frequency-Dependent Regulation of Transmitter Release by Endogenous Nitric Oxide at the Amphibian Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21: 1087-1095.

- Tom DS, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 142: 499-509.
- Trotta EE, de Meis L (1975) ATP-dependent calcium accumulation in brain microsomes. Enhancement by phosphate and oxalate. *Biochim Biophys Acta* 394: 239-247.
- Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* 21: 717-726.
- Usowicz MM, Gallo V, Culcandy SG (1989) Multiple Conductance Channels in Type-2 Cerebellar Astrocytes Activated by Excitatory Amino-Acids. *Nature* 339: 380-383.
- Verkhratsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 19: 346-352.
- Verkhratsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 380-412.
- Vernadakis A (1996) Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 49: 185-214.
- Villegas J (1975) Effects of cholinergic compounds on the axon-Schwann cell relationship in the squid nerve fiber. *Fed Proc* 34: 1370-1373.
- Virchow. Über das granuliertes Ansehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allg.Z.Psychiatrie.Psychol.Med.* 3, 242-250. 1846.
- Worden MK, Bykhovskaia M, Hackett JT (1997) Facilitation at the lobster neuromuscular junction: a stimulus-dependent mobilization model. *J Neurophysiol* 78: 417-428.
- Zengel JE, Sosa MA, Poage RE (1993) omega-Conotoxin reduces facilitation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Brain Research* 611: 25-30.
- Zenisek D, Matthews G (2000) The role of mitochondria in presynaptic calcium handling at a ribbon synapse. *Neuron* 25: 229-237.
- Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M, Krzan M, Li N, Sul JY, Halassa M, Van Bockstaele E, Zorec R, Haydon PG (2004) Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 279: 12724-12733.

- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6: 43-50.
- Zucker RS, Lara-Estrella LO (1983) Post-tetanic decay of evoked and spontaneous transmitter release and a residual-calcium model of synaptic facilitation at Crayfish neuromuscular junctions. *Journal of General Physiology* 81: 355-372.
- Zylinska L, Kawecka I, Lachowicz L, Szymraj J (2002) The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump. *Cell Mol Biol Lett* 7: 1037-1045.

2 Chapitre deuxième

***Modulation de la transmission synaptique
par les élévations calciques présynaptiques et gliales
de la jonction neuromusculaire de grenouille***

2.1 Introduction

Il a été démontré au niveau de plusieurs préparations que la relâche de Ca^{2+} des réserves présynaptiques (réticulum endoplasmique ou mitochondries) pouvait participer au contrôle de l'exocytose des NT lors de l'activité synaptique (Etcheberrigaray et al., 1991; Tang et Zucker, 1997; Martin et Buno, 2003). Qu'il s'agisse d'emmagasiner le Ca^{2+} à l'intérieur de ces organelles afin d'en terminer l'action au niveau des zones actives, ou encore de la relâche de Ca^{2+} de ces réserves, elles constituent un mécanisme de contrôle de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des terminaisons présynaptiques.

D'autre part, il a été démontré que l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des cellules gliales pérисynaptiques pouvait elle aussi moduler l'activité de la synapse à laquelle elles sont associées (Parpura et al., 1994; Newman et Zahs, 1998; Kang et al., 1998; Robitaille, 1998; Araque et al., 1998a). De plus, des résultats ont montré qu'une élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des cellules gliales était non-seulement nécessaire, mais aussi suffisante pour produire des changements de l'efficacité synaptique chez des co-cultures d'astrocytes et de neurones d'hippocampe (Araque et al., 1998b).

Bien que la contribution des réserves calciques présynaptiques et gliales dans la TS aient été démontrées isolément, aucune analyse de la contribution différentielle et relative des 2 types de réserves calciques (gliale et présynaptique) dans le contrôle de la transmission synaptique à une même synapse n'avait été faite.

Une telle étude implique l'utilisation d'une préparation « *in situ* » dans laquelle les interactions entre les éléments présynaptique, postsynaptique et glial sont maintenues intactes. Nous avons exploré cette question en utilisant la JNM de grenouille *Rana pipiens*. À cette synapse, il a été démontré que les réserves calciques présynaptiques pouvaient contribuer à la TS par le phénomène de largage calcique induit par le Ca^{2+} (Narita et al., 1998). D'autre part, il y a été démontré que l'activité synaptique pouvait induire des élévations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs ; Jahromi et al., 1992). De plus, toujours à la JNM d'amphibien, il a été mis en évidence par Robitaille (1998) qu'une modulation gliale de la TS était induite suite à l'activation du métabolisme des CSPs (activation non-spécifique des protéines G par le $\text{GTP}_{\gamma}\text{S}$). Toutes ces données indiquaient qu'à la JNM de grenouille, nous devons être en présence d'un mécanisme de régulation synapse – glie – synapse, pouvant mettre à contribution les réserves calciques présynaptiques et gliales.

Figure 1 Schéma des interactions neurone-glie-neurone à la JNM de grenouille

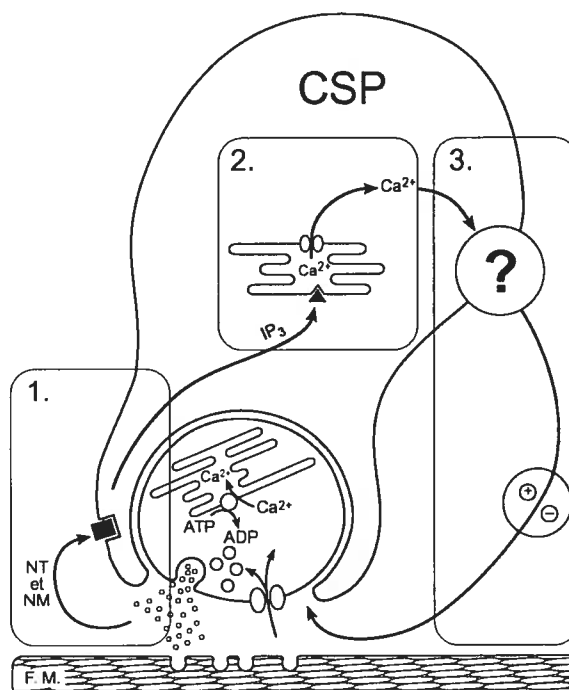


Figure 1. 1. L'activité synaptique induit la libération de neurotransmetteurs (ATP, ACh, peptides...) de la terminaison nerveuse. Ces neurotransmetteurs vont agir au niveau de l'élément postsynaptique (F.M. : fibre musculaire), mais aussi au niveau de leurs récepteurs gliaux spécifiques. 2. La transduction du signal des neurotransmetteurs au niveau de leurs récepteurs gliaux entraîne une élévation de la concentration calcique intracellulaire des CSPs. 3. L'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs initie une série d'événements conduisant à des changements de l'efficacité synaptique.

Afin d'étudier les contributions respectives des réserves présynaptiques et gliales dans le phénomène de TS, nous avons utilisé la thapsigargin (TG), un inhibiteur de la pompe Ca^{2+} -ATPase (Rasmussen et al., 1978; Thastrup et al., 1990), afin de bloquer la capture du Ca^{2+} à l'intérieur de ces réserves de façon irréversible. Grâce à l'indicateur calcique Fluo-3 AM, nos résultats montrent que la TG induit une élévation calcique transitoire au niveau des CSPs (due à la vidange lente et complète des réserves suivant l'inactivation de la pompe Ca^{2+} -ATPase), alors qu'aucune élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ n'a pu être détectée au niveau des terminaisons nerveuses

présynaptiques. Au niveau présynaptique, la TG a pour effet de prolonger les élévations calciques intracellulaires induites par l'arrivée d'un potentiel d'action, sans produire une élévation détectable de la $[Ca^{2+}]_i$ de repos. De plus, une accumulation de Ca^{2+} présynaptique a pu être observée suite à des stimulations nerveuses à haute fréquence en présence de TG. Ainsi, les réserves calciques présynaptiques sensibles à la TG semblent être vides au repos et jouer un rôle dans la séquestration du Ca^{2+} entré suite à l'arrivée de potentiels d'action, afin d'en limiter l'effet au niveau de la relâche de NT.

Lorsqu'elle est appliquée dans le bain, la TG induit une potentialisation de l'amplitude des potentiels de plaque motrice (PPM) suivant deux phases : une première, rapide et soutenue, à laquelle vient se superposer une deuxième phase de potentialisation de plus grande amplitude, lente et transitoire. Nos résultats tendent à montrer que ces effets sont présynaptiques, puisque l'amplitude et le déroulement temporel des PPM miniatures ne sont pas affectés. La première phase de potentialisation serait due à la capacité réduite de séquestration du Ca^{2+} présynaptique suite à l'inactivation de la pompe Ca^{2+} -ATPase des réserves présynaptiques. Quant à elle, la deuxième phase de potentialisation de la TS semble être d'origine gliale, puisque l'injection spécifique d'un chélateur de Ca^{2+} (BAPTA) dans les CSPs pouvait bloquer cette deuxième phase, sans toutefois affecter la première. Inversement, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs par l'injection d' IP_3 cause une potentialisation de la TS suivant la même cinétique que la potentialisation gliale. De plus, lorsque la capacité de chélation du Ca^{2+} des CSPs est augmentée par l'injection de BAPTA,

nous avons noté une plus grande dépression induite par la stimulation du nerf moteur de la préparation (10 Hz / 80 sec).

Dans les pages qui suivent, le lecteur trouvera le texte intégral de l'article relatant ces résultats, paru dans le *Journal of Neuroscience* en mars 2001.

Référence complète: Castonguay A. et Robitaille R. Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca^{2+} internal stores at the neuromuscular synapse. *Journal of Neuroscience*. 2001 Mar 15;21(6):1911-22.

© Journal of Neuroscience, 2001. Reproduit avec permission.

Lien : <http://www.jneurosci.org/cgi/reprint/21/6/1911.pdf>


Contribution de l'étudiante : L'étudiante a effectué les expériences, leur analyse, l'interprétation des données et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Robitaille.

2.2 Article du chapitre deuxième

DIFFERENTIAL REGULATION OF TRANSMITTER RELEASE BY PRESYNAPTIC AND GLIAL Ca^{2+} INTERNAL STORES AT THE NEUROMUSCULAR SYNAPSE

Annie Castonguay and Richard Robitaille
Centre de Recherche en Sciences Neurologiques
and
Département de physiologie
Université de Montréal
Montréal, Canada
H3C 3J7

Address for correspondence: Richard Robitaille
Département de physiologie
Université de Montréal
P.O. Box 6128, station "Centre-Ville"
Montréal, Canada
H3C 3J7
Tel #: (514) 343-6111, ext 1946
Fax #: (514) 343-2111



Acknowledgements

The authors wish to thank Milton P. Charlton, John Georgiou and Vincent F. Castellucci for reading various versions of the manuscript and for helpful discussion. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR; MT 14137), an FCAR team grant (00ER2119) and awards from the EJLB Research Foundation and The Alfred P. Sloan Foundation to R.R. A.C. was initially supported by a studentship from a FCAR research group on central nervous system and a FRSQ-FCAR studentship, and is now supported by a CIHR studentship. R.R. was a FRSQ Junior II Scholar and a CIHR Investigator.

2.2.1 Summary

The differential regulation of synaptic transmission by internal Ca^{2+} stores of presynaptic terminals and perisynaptic Schwann cells (PSCs) was studied at the frog neuromuscular junction. Thapsigargin (tg), an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase pumps of internal stores, caused a transient Ca^{2+} elevation in PSCs whereas it had no effect on Ca^{2+} stores of presynaptic terminals at rest. Tg prolonged presynaptic Ca^{2+} responses evoked by single action potentials with no detectable increase in resting Ca^{2+} level in nerve terminals. However, Ca^{2+} accumulation was observed during high frequency stimulation. Tg induced a rapid rise in endplate potential (EPP) amplitude accompanied by a delayed and transient increase. The effects appeared presynaptic as suggested by the lack of effects of tg on the amplitude and time course of miniature EPPs (MEPPs). However, MEPP frequency was increased when preparations were tonically stimulated (0.2 Hz). The delayed and transient increase in EPP amplitude was occluded by injections of the Ca^{2+} chelator BAPTA into PSCs before tg application, while a rise in intracellular Ca^{2+} in PSCs induced by inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) injections potentiated transmitter release. Furthermore, increased Ca^{2+} buffering capacity following BAPTA injection in PSCs resulted in a more pronounced synaptic depression induced by high frequency stimulation of the motor nerve (10 Hz/80s). It is concluded that presynaptic Ca^{2+} stores act as a Ca^{2+} clearance mechanism to limit the duration of transmitter release whereas Ca^{2+} release from glial stores initiates Ca^{2+} -dependant potentiation of synaptic transmission.

Key Words: Perisynaptic Schwann cells; ATPase pump; calcium; frog neuromuscular junction; transmitter release; synaptic transmission; synapse-glia interactions; IP₃.

2.2.2 Introduction

Ca²⁺ entry through voltage-gated Ca²⁺ channels clustered at active zones (Robitaille et al., 1990; Cohen et al., 1991) is a necessary step leading to transmitter release (Zucker, 1993a; Kamiya and Zucker, 1994) where the concentration of Ca²⁺ determines the amount of transmitter released (Augustine et al., 1987; Zucker, 1993b).

The release of Ca²⁺ from presynaptic internal stores also regulates the amount of transmitter released at various synapses (Guo et al., 1996; Tse et al., 1997; Peng, 1996; Smith and Cunnane, 1996; Li et al., 1998; Lin et al., 1998; Cao and Peng, 1998; Krizaj et al., 1999; Tse and Tse, 1998; He et al., 2000). Moreover, the ATPase pump that re-loads the stores by pumping Ca²⁺ ions from the cytoplasm, modulates transmitter release by participating in the clearance of Ca²⁺, limiting its spread and duration away from the mouth of Ca²⁺ channels (Fossier et al., 1998). At the amphibian neuromuscular junction (nmj), the release of Ca²⁺ from presynaptic stores increases asynchronous release of transmitter via a Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) mechanism (Narita et al., 1998) whereas it results in a depression of transmitter release at the rat nmj (Schwartz et al., 1999).

In addition to the presynaptic Ca²⁺ components in the regulation of transmitter release, recent evidence has revealed that perisynaptic glial cells (glial

cells associated with synapses) also modulate synaptic activity (Kang et al., 1998; Newman and Zahs, 1998; Robitaille, 1998; Carmignoto et al., 1998; Araque et al., 1999). This modulation occurs via the release of Ca^{2+} from internal stores (often IP_3 -regulated) and the Ca^{2+} elevation is both necessary and sufficient for the glial modulation to occur (Araque et al., 1998, 1999; Castonguay et al., 2000a). Moreover, this modulation is observed during normal synaptic activity in a frequency-dependent manner (Robitaille, 1998). This suggests that synaptic efficacy is regulated by a synapse-glia-synapse loop in which Ca^{2+} release from presynaptic and glial internal stores plays a crucial role.

Although there is now compelling evidence that transmitter release is not only regulated by internal stores of the presynaptic terminal but also by the stores of perisynaptic glial cells, there is no direct analysis of their differential contribution in the control of transmitter release. Therefore, the main goal of this work was to understand the respective roles of the presynaptic and glial Ca^{2+} stores in the regulation of transmitter release. We used thapsigargin (tg), an inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase pump (Rasmussen et al., 1978), to block Ca^{2+} uptake into the stores of perisynaptic Schwann cells (PSCs) and nerve terminals at the frog nmj.

We show that tg application slowed the Ca^{2+} clearance in presynaptic nerve terminals, causing an irreversible increase of miniature endplate potentials (MEPPs) frequency and evoked transmitter release. Moreover, tg transiently elevated Ca^{2+} in PSCs by emptying their internal stores. Using specific Ca^{2+} chelator and IP_3 injections into PSCs, we show that Ca^{2+} release from PSCs internal stores potentiates transmitter release, and that high frequency depression is more pronounced when Ca^{2+} buffering capacity of PSCs is elevated.

2.2.3 Materials and methods

Labelling With Fluorescent Thapsigargin

Frogs (*Rana pipiens*) were anesthetized using 3-aminobenzoic acid ethyl ester (0.3 mg/g frog; prepared in frog Ringer solution) and then double pithed. The *cutaneus pectoris* muscle was then dissected out of the frog, along with the *pectoralis proprius* nerve.

To visualize binding sites of tg, nerve-muscle preparations were incubated 5 minutes in normal frog Ringer (in mM: 120 NaCl, 5 MgCl₂, 2 KCl, 1 NaHCO₃ and 15 HEPES, 1.8 CaCl₂ pH adjusted to 7.20 with NaOH 5N) containing fluorescent thapsigargin (f-tg; 2 μ M), with 1% final dimethyl sulfoxide (DMSO). Muscles were then rinsed 6 times using normal frog Ringer (final DMSO concentration 1%) to eliminate background fluorescence. To test the specificity of the labelling with f-tg, unlabelled thapsigargin (2 μ M) was applied on the preparation for 5 minutes and rinsed as described above prior to incubation with f-tg (2 μ M, 1% final DMSO concentration). Double staining of the preparation was performed using peanut agglutinin lectin-TRITC (PNA-T, 15 μ g/ml for 15 minutes in normal Ringer) to reveal the presence of nmjs (Ko, 1987) and to determine whether tg-f labelling was located at the nmj.

Images of f-tg and PNA-T were simultaneously acquired using the dual channel configuration of the Bio-Rad MRC-600 confocal microscope. The excitation wavelength (514 nm) was attenuated to 1% using neutral density filters. Green fluorescence emitted by f-tg was detected by one photomultiplier tube (PMT) through

a band pass filter (505-535 nm) while the red signal emitted by PNA-T was detected by another PMT through a long-pass filter (cut-off at 590 nm).

Ca²⁺ Imaging of Nerve Terminals

For specific imaging of presynaptic nerve terminals, the *pectoralis proprius* nerve of *cutaneus pectoris* muscle was dissected through a small opening in the skin of the frog and laid on the thorax of the animal. After washing the cut end of the nerve with Mg²⁺ Ringer solution (containing 5 mM MgCl₂, no Ca²⁺ added) to minimize the closing of the extremity of the axons, crystals of Ca²⁺-green -1 dextran (MW 3,000) were put on the cut end of the nerve and the preparation was left to incubate overnight (~14 hrs) at room temperature (21 °C). After the incubation period, muscles were dissected from the frog, pinned down in a recording chamber and bathed in normal Ringer solution. Muscle contractions were prevented by blocking cholinergic receptors with α -bungarotoxin (1 μ M). It has been demonstrated that α -bungarotoxin has no effect on PSCs cholinergic-evoked Ca²⁺ signals (Jahromi et al., 1992; Robitaille et al., 1997).

Nerve stimulation was delivered through a suction electrode using a S88 Grass stimulator. The line scan mode of the BioRad 600 confocal microscope was used to study Ca²⁺ responses elicited by brief motor nerve stimulation (100 Hz, train duration of 100 ms) or by single pulses at 0.2 Hz. Each line scan occurred at intervals of 2 ms and a total of 512 lines were acquired every scan. Twenty (20) line scans were averaged twice during control and 20 line scans were collected 15 min after tg application. The amplitude and duration of the average Ca²⁺ responses

evoked by single stimulus were stable during the control period. When monitoring Ca^{2+} changes over longer periods of time, confocal images (192 by 128 pixels) were taken every 645 ms at the same focal plane. Presynaptic nerve terminals were monitored at rest and during prolonged motor nerve stimulation (50 or 100 Hz for 30s).

Changes in fluorescence were monitored using a Bio-Rad MRC 600 confocal microscope equipped with an argon ion laser producing an excitation wavelength at 488 nm. The intensity of the laser was attenuated to 1% using neutral density filters and the emitted light was detected through a long-pass filter at 515 nm.

Ca^{2+} Imaging of Perisynaptic Schwann Cells

For Ca^{2+} imaging of PSCs and muscle fibers, *cutaneus pectoris* muscles were dissected from the frogs and incubated for 90 minutes in a 10 μM fluo-3 AM solution prepared in normal Ringer solution containing 1% DMSO and 0.02% pluronic acid, at room temperature (21 °C). After incubation, muscles were bathed in normal Ringer solution containing TPEN (tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine, 20 μM) with 0.01% EtOH. The time course of fluorescence changes in PSCs and muscle fibers were monitored using the 488 nm line of the argon ion laser (attenuated to 1%) of a Bio-Rad MRC 600 confocal microscope and the emitted light was detected through a long-pass filter at 515 nm. Images (192 by 128 pixels) were acquired every 645 ms before, during and after tg application.

Electrophysiological Recordings of Synaptic Transmission

Intracellular recordings of EPPs were performed using glass microelectrodes (10-15 M Ω) filled with KCl (2M). The motor nerve was stimulated using supra-threshold pulses applied via a suction electrode and muscle contractions were blocked using d-tubocurarine chloride (6 μ M). The stimulation paradigm consisted of a paired pulse stimulation (10 ms) delivered at 0.2 Hz. EPPs were acquired as an average of 4 using Tomahacq software (by T.A. Goldthorpe, University of Toronto). For measurements of spontaneous activity, MEPPs were recorded in normal Ringer solution in absence of d-tubocurarine chloride and recorded in consecutive frames of 250 ms with Tomahacq software.

Procedure for BAPTA and IP₃ Injection in PSCs

The procedure used to perform the injection into PSCs and record the subsequent synaptic activity has been described in detail elsewhere (Robitaille, 1998). Briefly, a microelectrode (10-15 M Ω ; filled with KCl 1M) was inserted in the postsynaptic muscle fiber near an identified nmj, to record synaptic activity of the whole nmj. A focal electrode (2-3 M Ω , filled with Ringer) was then placed near a branch of the nmj to record synaptic activity of only that portion of the nmj. And finally, a third microelectrode (35-55 M Ω filled with 500 mM K-acetate) was used to penetrate the PSC covering the nerve terminal branch recorded by the focal electrode, and to ionophoretically inject (-2 to -5 nA 200 ms pulses every 500 ms for 120 s) a solution of 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N'N'N'-tetraacetic acid (BAPTA; 10 mM BAPTA tetrapotassium salt in 500 mM K⁺-acetate) or 1,4,5 Inositol triphosphate

(IP₃; 10 mM in 500 mM K⁺ acetate) into PSCs, along with a Ca²⁺ indicator (Ca²⁺ green -1 dextran, MW 3000). This method of injection has been shown not to perturb neurotransmitter release and PSCs' activity (Robitaille, 1998). In cases when synaptic depression was induced, the motor nerve was stimulated at 10 Hz for 80 s and the preparation was allowed to rest for 15 minutes before the second depression period was attempted. These procedures are known to produce stable and reproducible depression (Robitaille and Charlton, 1992; Robitaille, 1998).

Statistical Analysis

All values are presented as mean \pm standard error of the mean. Student paired t-test was used when comparing data obtained from the same cell or nmj while a one way Anova was performed when several treatments were compared. "N" indicates the number of preparations used, while "n" indicates the number of cells or nmjs.

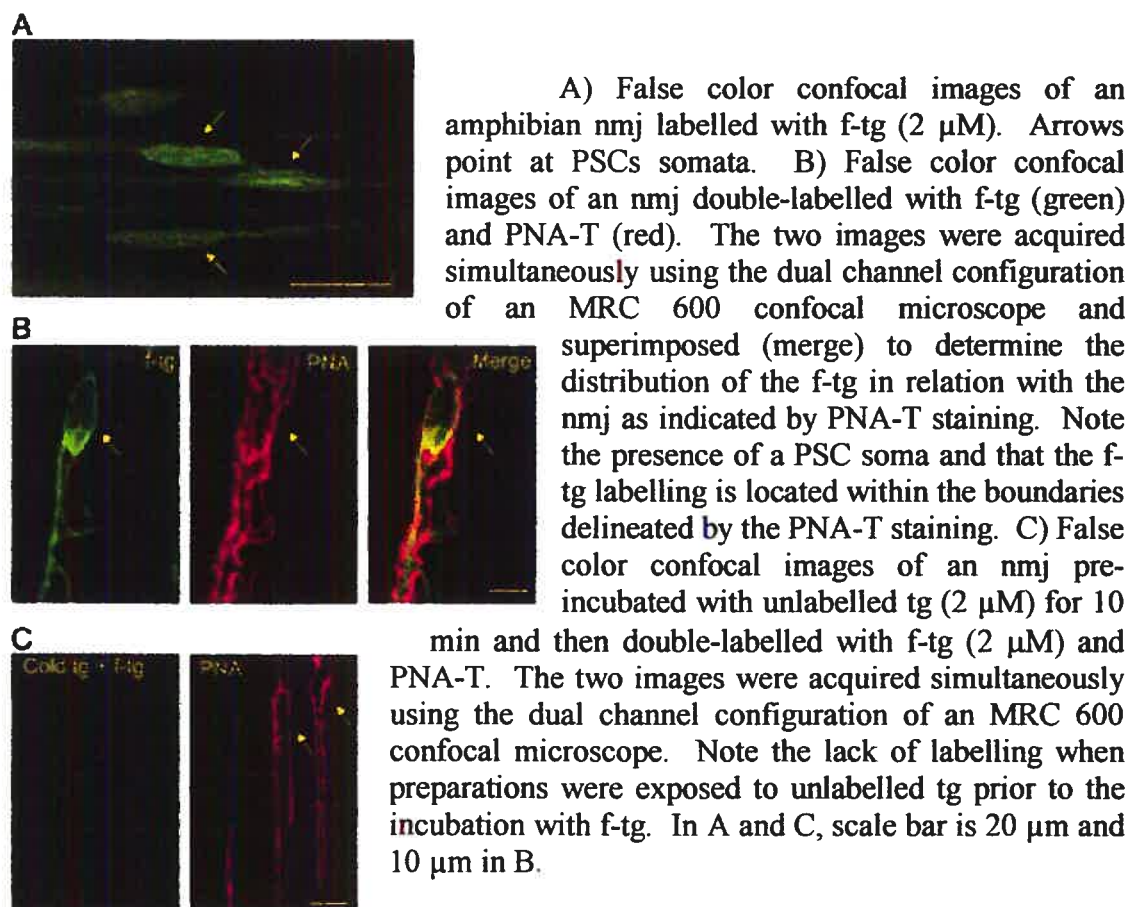
2.2.4 Results

Thapsigargin Binding Sites in PSCs and Presynaptic Nerve Terminals

Distribution of tg binding sites at the frog nmj was first examined using fluorescent thapsigargin (f-tg; BODIPY FL-Thapsigargin, Molecular Probes). Preparations were also labelled with fluorescent PNA-T to identify nmjs (Ko, 1987) and the two labels were simultaneously observed using the dual channel mode of a BioRad 600 confocal microscope. As shown in Figure 1 (A, B), f-tg was distributed

within the PNA-T labelled nmjs. Moreover, the staining pattern revealed that PSCs were labelled since their cell body region was heavily stained (Figure 1A). No fluorescence was ever associated with the muscle fibers, indicating that these cells do not possess tg receptors or that their density is too low to be detected by this approach. However, muscle fibers were heavily labelled by fluorescent ryanodine (BODIPY FL-X Ryanodine; Molecular Probes; data not shown). The labelling of f-tg appeared specific since pre-incubating the preparations with unlabelled tg prevented the staining normally observed with the f-tg as indicated by the lack of green labelling at nmjs identified by PNA-T staining (Figure 1C).

Figure 1 *Distribution of tg labelling at the frog nmj.*



These results indicate that tg binds to receptors located at PSCs. However, this technique cannot resolve whether there are also tg receptors in nerve terminals because the thickness of a confocal section ($\sim 4 \mu\text{m}$), is wider than the size of the nerve terminal diameter covered by PSCs processes ($\sim 2 \mu\text{m}$). Hence, experiments were next performed to investigate the functional effects of tg on PSCs and nerve terminals.

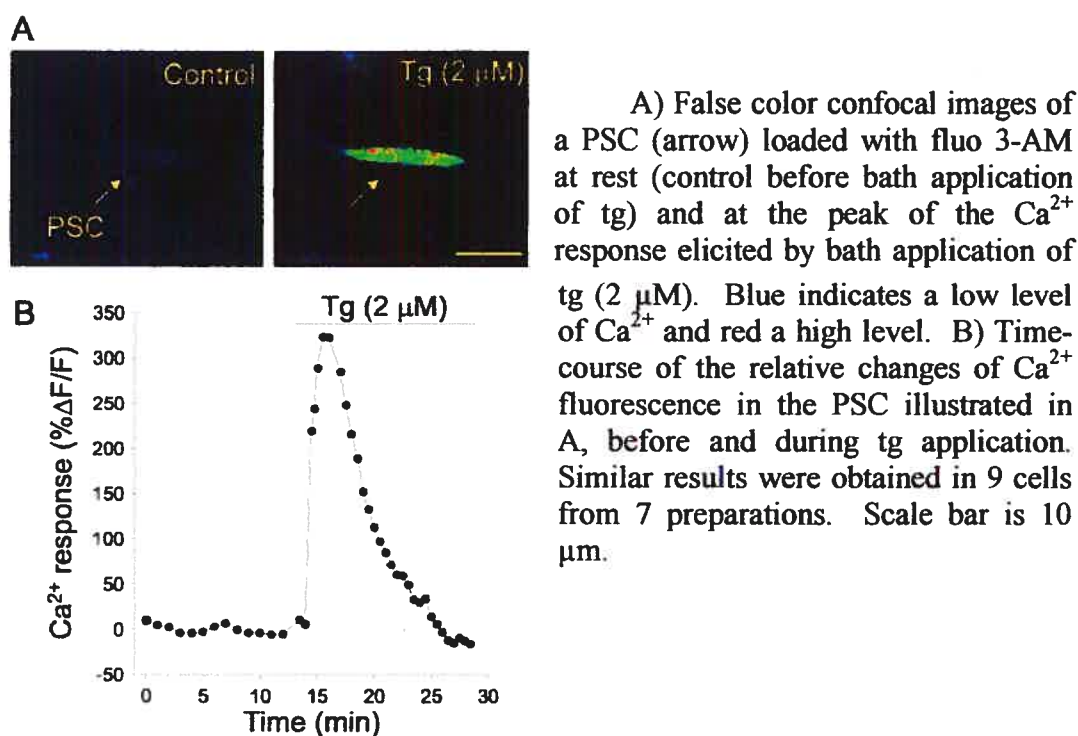
Thapsigargin-Evoked Calcium Responses in Perisynaptic Schwann Cells

The effects of tg ($2 \mu\text{M}$) on PSCs were first investigated by monitoring intracellular levels of Ca^{2+} using the membrane permeant calcium indicator, Fluo-3 AM. Because a membrane permeant indicator was used, the three compartments of the synapse (i.e. PSCs, nerve terminals and muscle fibers) were loaded with Fluo-3 and could display intracellular Ca^{2+} changes. To minimize the interference with presynaptic terminals, PSCs fluorescence was measured at the level of the cell body (Jahromi et al., 1992).

As shown in Figure 2, bath application of tg ($2 \mu\text{M}$) elicited a transient Ca^{2+} response in all PSCs tested ($N=7$, $n=9$). The size of the relative change in Ca^{2+} was $299 \pm 65\%$ of control. Responses occurred with a delay of 5 ± 2 min and had a duration (return to baseline) of 12 ± 2 minutes. This indicates that Ca^{2+} stores of PSCs were loaded with Ca^{2+} at rest and that the blockade of the ATPase pump resulted in a gradual leak of Ca^{2+} from the internal stores. The effects were irreversible since Ca^{2+} responses elicited by ATP ($50 \mu\text{M}$), an agonist that activate P2 receptors known to release Ca^{2+} from internal stores of PSCs (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995), were greatly reduced or abolished (data not shown). This indicates

that the internal Ca^{2+} stores could not be replenished after the effect of tg and remained empty. No changes in fluorescence were ever observed in muscle fibers following tg application. However, Ca^{2+} responses were induced in muscle fibers using ryanodine at the same concentration ($2\ \mu\text{M}$) as tg (data not shown).

Figure 2 *Thapsigargin causes a transient Ca^{2+} elevation in PSCs.*



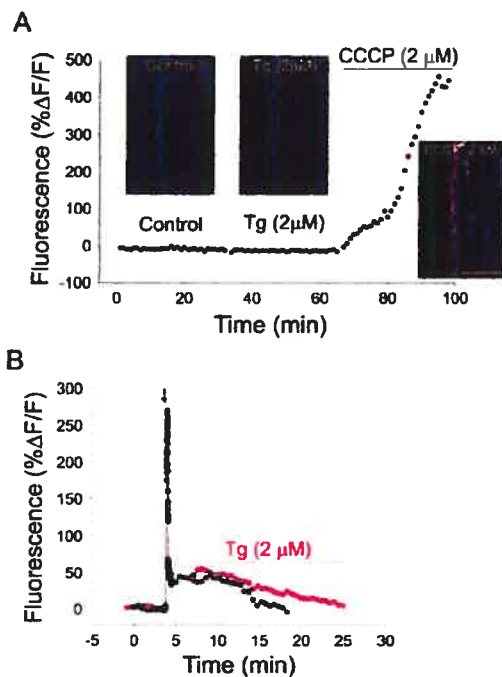
Thapsigargin Had No Effect on Nerve Terminal Ca^{2+} Level at Rest

To test whether thapsigargin affected Ca^{2+} stores of resting nerve terminals, we selectively loaded the terminals with another fluorescent Ca^{2+} indicator, Ca^{2+} -green-1 dextran (M.W. 3,000). To confine the Ca^{2+} indicator to nerve terminals without any possible contamination of the signal resulting from fluorescence of PSCs, crystals of the indicator were applied at the cut end of the nerve and allowed to

diffuse overnight to the nerve terminals (16 hrs). Tg (2 μ M) was then applied and changes in nerve terminal fluorescence were monitored using a BioRad 600 confocal microscope.

As shown in Figure 3A, there was no significant increase of fluorescence in resting nerve terminals in the presence of tg (2 μ M; 31.0 ± 6.0 pixel intensity in control and 32.9 ± 10.0 pixel intensity in tg), indicating that the level of intracellular Ca^{2+} remained unchanged ($P = 0.739$, Student paired t-test; $N=6$, $n=6$). To test whether we could have detected a change in the presynaptic fluorescence level, the same preparations were treated with CCCP, an inhibitor of mitochondrion metabolism, that causes these organelles to release their internal Ca^{2+} (Tang and Zucker, 1997). Figure 3A also shows the rise of fluorescence over time, relative to the control level after the application of CCCP. Augmentation of the fluorescence level was readily obtained, indicating that changes induced by tg could have been detected with our method. Hence, these results suggest that tg had no effect on the basal Ca^{2+} level of presynaptic nerve terminal at rest.

Figure 3 *Effects of thapsigargin on Ca^{2+} level of presynaptic terminals*



A) Relative changes of the basal fluorescence in a nerve terminal loaded with Ca^{2+} -green-1 dextran at rest, during the application of tg (2 μM) and in the presence of the mitochondria inhibitor CCCP (2 μM). Insets show false color images of the nerve terminal at rest (control) during the application of tg and in the presence of CCCP. Blue indicates low levels of Ca^{2+} and red high levels. Note that tg did not cause any Ca^{2+} elevation in the nerve terminal. However, CCCP (2 μM) induced a Ca^{2+} rise indicating that the detection method was appropriate. B) Relative changes of the fluorescence in a nerve terminal loaded with Ca^{2+} -green 1 dextran before, during and after a train of stimuli (100 Hz, 30s, arrow) in control (black circles) and in the presence of

tg (2 μM ; red circles) applied during the recovery phase of the response. Note that the presence of tg prolonged the recovery phase of the Ca^{2+} response. Scale bar in A is 25 μm .

Presynaptic Ca^{2+} Stores Play a Role in Ca^{2+} Clearance During High Frequency Stimulation

The observation that no Ca^{2+} changes could be elicited by tg in nerve terminals either indicated that these internal stores were empty in resting conditions, or that ATPase pumps sensitive to tg were lacking in the presynaptic terminals. To discriminate between the two possibilities, we challenged the presynaptic terminals with a large Ca^{2+} entry induced by repetitive high frequency stimulation to trigger the pumping of Ca^{2+} in the internal stores. In this case, tg should affect the clearance of Ca^{2+} if internal stores possess a tg-sensitive ATPase and would result in a prolonged

clearance of intracellular Ca^{2+} . Preparations were stimulated at frequencies of 50 or 100 Hz for 30 seconds in order to induce a large Ca^{2+} entry in nerve terminals. Figure 3B illustrates a nerve terminal Ca^{2+} response induced by a stimulation at 100 Hz for 30 s (black trace). The response was characterized by a rapid rise in Ca^{2+} followed by a fast phase of recovery that accounted for about 80% of the signal and a slower phase that lasted for 13 ± 3 min ($N = 5$, $n = 5$). These responses could be repeatedly obtained and showed no difference over time (data not shown). After full recovery, the preparation was stimulated again and tg was perfused immediately after the rapid phase of recovery. As shown in Figure 3B, the presence of $2 \mu\text{M}$ tg (red trace) significantly prolonged the second recovery phase (18 ± 3 min; $P = 0.020$, Student paired t-test). Similar results were observed using stimulation at 50 Hz. These results indicate that following a massive Ca^{2+} entry into the nerve terminal, Ca^{2+} is pumped into the Ca^{2+} stores and that the blockade of the ATPase pump by tg leads to a reduced clearance capability resulting in a prolonged elevation of cytoplasmic Ca^{2+} level.

Regulation of Fast, Phasic Ca^{2+} Entry by the Presynaptic ATPase Pump of Internal Stores

Ca^{2+} transients elicited by single pulse stimulation were monitored in nerve terminals to test whether the presynaptic ATPase pumps were able to limit the duration of this phasic Ca^{2+} entry. Ca^{2+} entry in nerve terminals was monitored using the line scan mode of a Bio Rad MRC 600 confocal microscope which allowed us to detect changes at intervals of 2 ms. Ca^{2+} entry induced by single action potentials in nerve terminals were recorded in control and in the presence of tg in each experiment.

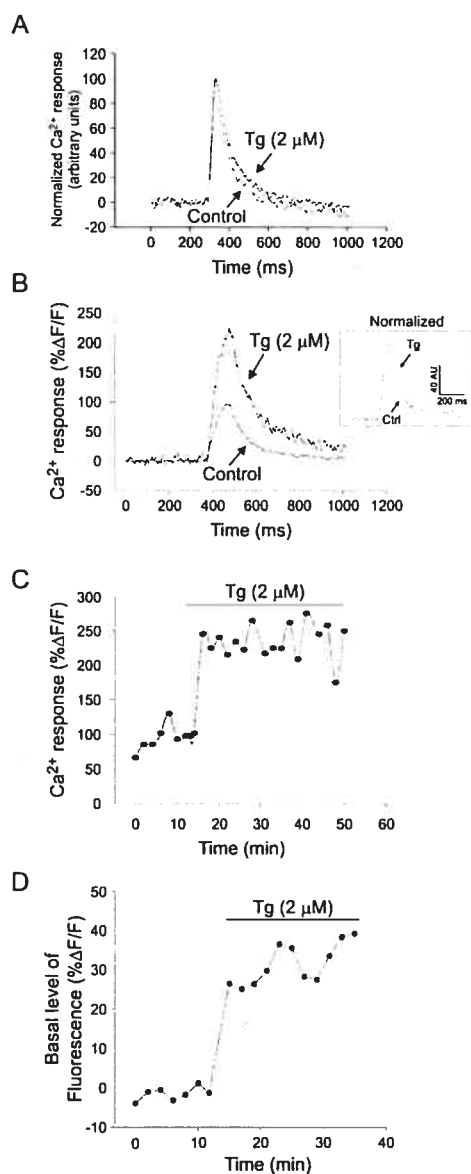
Two series of control measurements were consecutively performed and no difference was observed between the peak and total duration of the responses ($P=0.756$, Student paired t-test, $N=7$, $n=7$). Bath application of tg ($2\ \mu\text{M}$) did not affect the peak amplitude of Ca^{2+} responses (24.5 ± 4.7 and $26.2 \pm 5.0\%$ in control and in the presence of tg, respectively; $P = 0.094$; Student paired t-test, $N=7$, $n=7$). Responses were normalized to peak amplitude for all trials before analyzing the decay time as a function of the area under the curve, to minimize the impact in variations of the size of Ca^{2+} responses on the measurement of their duration. We found that the decay time of the responses was significantly longer in the presence of tg (6011 ± 901 and $7114 \pm 882\ \%\Delta F/F^*s$ in control and in the presence of tg, respectively; $P < 0.001$; Student paired t-test, $n = 7$, $N = 7$; Figure 4A). These results are consistent with the role of clearance of the presynaptic ATPase pump which efficiently regulates Ca^{2+} during low level of activity.

The same measurements were made on Ca^{2+} entry in nerve terminals elicited by a train of 10 pulses (100 Hz/100 ms). One would predict that the Ca^{2+} entry elicited by the 10 consecutive pulses would cause a build up of intracellular calcium, resulting in larger and prolonged Ca^{2+} responses. As shown in Figure 4B, the blockade of ATPase pump by tg resulted in a prolonged period during which cytoplasmic Ca^{2+} was elevated, leading to an accumulation of residual Ca^{2+} . Indeed, in these conditions, not only were the resulting Ca^{2+} responses longer (from 8150 ± 188 to $10165 \pm 221\ \%\Delta F/F^*s$ after normalization to peak amplitude; $N=6$, $n=6$; $P < 0.001$, Student paired t-test), but the peak of these responses was also increased by 76% (from 174 ± 24 to $230 \pm 12\ \%\Delta F/F$; $P < 0.05$, Student paired t-test; $N= 6$, $n=6$) in the

presence of tg. The effects were maximal 5 ± 2 min following bath application of tg, were irreversible and remained stable for as long as 80 min (Figure 4B,C).

We next wondered whether low frequency repetitive stimulation of the motor nerve would produce a rise in the resting level of Ca^{2+} in nerve terminals. This was tested by monitoring the fluorescence of nerve terminals during low frequency stimulation of the motor nerve before and after application of tg. Bath application of tg during low frequency stimulation of the motor nerve did not induce significant changes in resting fluorescence of presynaptic terminals where the mean resting fluorescence in pixel intensity changed from 44 ± 3 to 41 ± 4 ($P > 0.05$, Student paired t-test; $N = 3$, $n=3$; data not shown). However, when using bursts of stimulation (100 Hz / 100 ms every 2 minutes) known to induce an accumulation of Ca^{2+} (Figure 4B), a significant rise in resting fluorescence was obtained (Figure 4D; $N = 5$, $n=5$; $P < 0.001$, Student paired t-test). These results indicate that during repetitive stimulations, the blockade of the presynaptic ATPase pump induced a detectable, activity-dependant global elevation of cytoplasmic intracellular Ca^{2+} .

Figure 4 *Thapsigargin prolongs Ca^{2+} clearance in nerve terminals*



A) Relative changes in fluorescence emitted by a nerve terminal back-filled with Ca^{2+} -green-1 and obtained using the line scan mode of the Bio-Rad 600 confocal microscope. Each record is an average of 20 individual traces normalized to peak amplitude for Ca^{2+} responses evoked by a single action potential before (control) and after 15 min of perfusion with tg (2 μM). Note that tg prolonged the duration of the recovery of Ca^{2+} response. B) Relative changes in fluorescence emitted by a nerve terminal back-filled with Ca^{2+} -green-1 and obtained using the line scan mode of the Bio-Rad 600 confocal. Ca^{2+} responses evoked by brief train of stimuli (100 Hz, 100 ms) in control and 20 min after the beginning of tg (2 μM) perfusion. The control record is an average of 8 individual traces. Note that both the duration and the amplitude of the Ca^{2+} responses were increased in the presence of tg. Inset: average of 10 traces normalized to peak amplitude in control and after tg application. AU= arbitrary units of fluorescence. C) From the same experiment as in B, amplitude of Ca^{2+} responses collected following a 100 Hz/100 ms stimulation and plotted as a function of time before and during tg application. Note that the effect occurs

rapidly and persist throughout the application of tg. D) Relative changes of the basal fluorescence in a nerve terminal loaded with Ca^{2+} -green-1 dextran and stimulated at 2 min intervals with trains of 100 Hz, 100 ms before and during the application of tg (2 μM). Note the elevation of the basal Ca^{2+} level in the nerve terminal a few minutes following tg application.

Thapsigargin Potentiates Transmitter Release at the Frog Neuromuscular Junction

Our results indicate that tg acted rapidly on nerve terminals to irreversibly block Ca^{2+} pumping into the internal stores while it caused a slow and delayed calcium transient that emptied Ca^{2+} stores in PSCs, also in an irreversible manner. To test whether neuromuscular synaptic transmission was affected by tg, evoked transmitter release (paired pulses, interval of 10 ms at 0.2 Hz) was recorded while tg ($2\ \mu\text{M}$) was administered in the bath. Figure 5A shows that the amplitude of the evoked postsynaptic responses increased as a consequence of bath application of tg ($2\ \mu\text{M}$). The augmentation in the amplitude of the first EPP followed two phases: first, the amplitude of the evoked responses increased rapidly after tg administration and stabilized briefly before a second slower and transient phase occurred which further increased EPP amplitude. Also, EPP amplitude did not return to control level and remained higher than control after the second phase. The period of maximal effect of tg will be identified as the peak effect whereas the period following the transient phase of increase will be identified as the stable effect. The mean EPP amplitude at the peak effect in tg was $4.4 \pm 0.04\ \text{mV}$ which represents an increase of $88 \pm 38\%$ of control value ($1.89 \pm 0.02\ \text{mV}$; $N=6$, $n=6$). At the stable period, the mean EPP amplitude was $2.17 \pm 0.01\ \text{mV}$ ($N=4$, $n=4$) which represents an increase of $15 \pm 5\%$. These increases in EPP amplitude were significant at the peak and stable period (one way Anova, $P < 0.05$).

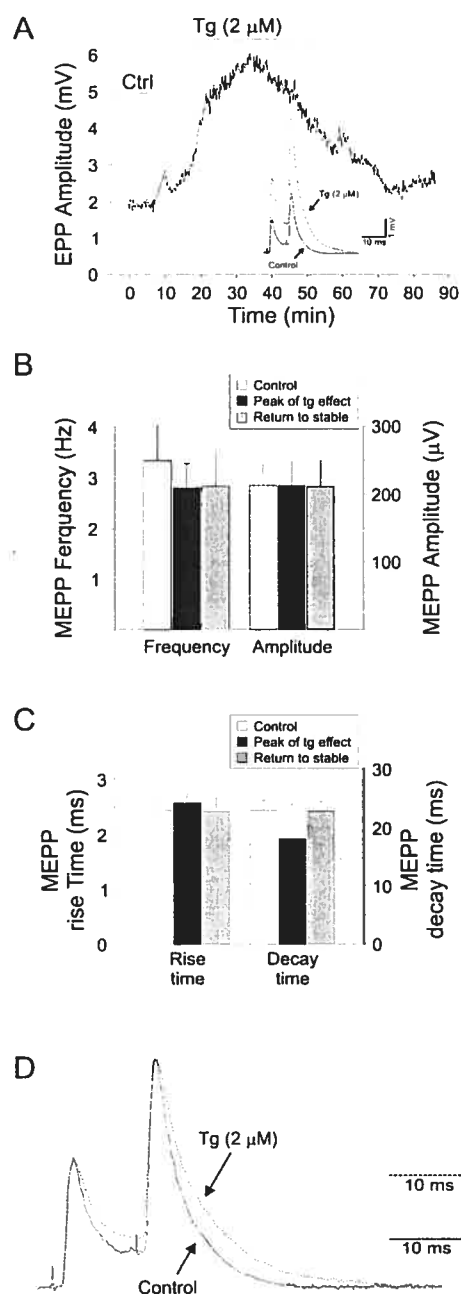
Analysis of MEPPs was performed to determine whether the observed potentiation of synaptic transmission was presynaptic in origin. In the absence of nerve stimulation, there was no significant difference in MEPP amplitude ($P = 0.32$, $N=5$, $n=5$) or frequency ($P = 0.37$, $N=5$, $n=5$, one way Anova) between control and in

the presence of tg at times corresponding to the peak or the stable period (Figure 5B). MEPP amplitude and frequency were respectively $230 \pm 20 \mu\text{V}$ and $3.2 \pm 0.7 \text{ Hz}$ in control, $210 \pm 20 \mu\text{V}$ and $2.8 \pm 0.5 \text{ Hz}$ during the peak period and $205 \pm 4 \mu\text{V}$ and $2.9 \pm 0.7 \text{ Hz}$ during the stable period. Also, the rise time of MEPPs in control, peak and stable periods remained unchanged (respectively 2.45 ± 0.3 , 2.58 ± 0.3 and $2.43 \pm 0.5 \text{ ms}$; $P=0.702$, one way Anova), so as the decay time (respectively 22.9 ± 3.7 , 18.2 ± 2.7 and $22.9 \pm 1.3 \text{ ms}$; $P=0.678$; one way Anova; Figure 5C). These results suggest that the augmentation of EPP amplitude was mainly due to an increase in the number of released transmitter quanta. However, on stimulated preparations (continuous stimulation at 0.2 Hz), MEPP frequency was significantly increased in the presence of tg ($3.8 \pm 1.7 \text{ Hz}$ in control and $17.7 \pm 4.0 \text{ Hz}$ in tg; $P < 0.001$; Student paired t test; $N=7$, $n=7$). These results suggest that the blockade of ATPase pumps caused a local rise in Ca^{2+} which then lead to an increase in MEPP frequency.

We next tested whether paired-pulse facilitation was affected by tg since it is believed to be dependent upon the level of residual Ca^{2+} and that tg affects the clearance of Ca^{2+} . Paired-pulse facilitation was measured as the ratio $((\text{EPP1} - \text{EPP0})/\text{EPP0})$ between two EPPs evoked at 10 ms interval. For each experiment, twenty responses (average of 4 EPPs per response) were analyzed in control, at the peak and stable period. The measured facilitation ratio in control, at the peak and stable periods were respectively 0.48 ± 0.04 , 0.44 ± 0.03 and 0.54 ± 0.03 . These values are not significantly different from control ($P=0.27$; $N=4$, $n=4$, one way Anova). This is illustrated in Figure 5C where an average of 32 pairs of EPPs for control and during the peak period are superimposed with the first EPP normalized for the amplitude of the control EPP. The second average EPP in the presence of tg

matched the one of control, suggesting that facilitation was not affected by tg. However, unlike MEPP decay time, a slowing in EPP decay rate recorded in the presence of tg was observed.

Figure 5 *Thapsigargin potentiates transmitter release*



A) Changes in amplitude of the first evoked EPP, before, during and after bath application of tg (2 μ M). EPPs were evoked by paired pulse stimulation (10 ms interval) at 0.2 Hz. Shown in inset are EPPs in control and at the peak of tg effect (tg). Note that the potentiation of EPP amplitude by tg is transient and that a partial recovery is observed even when tg is still present in the perfusate. Following the transient phase, EPP amplitude stabilized above the control level. B) Histograms of MEPP frequency and amplitude obtained on non-stimulated preparations ($n = 5$) in control and at times corresponding to the peak of the tg effect and the stable recovery phase. Note that tg had no effect on MEPP amplitude and frequency. C) Histograms of MEPP rise time and decay time obtained on non-stimulated preparations ($n = 5$) in control and at times corresponding to the peak of the tg effect and the stable recovery phase. Note that tg had no effect on either the rise or decay time of the minis. D) EPPs evoked by paired pulse stimuli in control and at the peak of tg (2 μ M) effects. The amplitude of the first EPP recorded in the presence of tg was adjusted to fit the amplitude of the first EPP in control. Note that the amplitude of the second EPPs of the pairs recorded in control and in the presence of tg are perfectly superimposed suggesting that the level of facilitation was the same in both conditions.

PSCs Contribute to Potentiation of Synaptic Transmission

Our results indicate that the action of tg on nerve terminals alone cannot account for effects observed on transmitter release. Indeed, we observed a slow and transient increase in transmitter release, that could not be explained solely by the rapid and steady effects of tg on the duration of presynaptic Ca^{2+} responses (see Figure 4C). Interestingly, tg elicited in PSCs a slow and transient rise in Ca^{2+} suggesting that these cells might be responsible for the slow and transient rise in evoked EPP amplitude. We therefore hypothesized that the effects of tg on presynaptic terminals would be responsible for the rapid rise in evoked EPP amplitude, whereas the depletion of PSCs internal Ca^{2+} stores by tg would cause the transient and reversible component of this response (see Figure 5A).

We tested this hypothesis by injecting a Ca^{2+} chelator directly into PSCs prior to tg application on the preparation. This maneuver was intended to selectively occlude the effects of tg on the injected PSCs by limiting the rise in Ca^{2+} consequent to the blockade of the ATPase pump. A multiple electrode recording technique was used to inject the chelator while monitoring transmitter release (Robitaille, 1998; Figure 6A). One electrode was used for intracellular recording of synaptic activity, another one focally recorded the activity in the branch of nerve terminal covered by a PSC injected using the third electrode. Hence, if indeed the Ca^{2+} elevation in PSCs was directly responsible for the slow and transient potentiation in transmitter release, the focal electrode that only records the portion of the terminal covered by the injected PSC should not present the second transient phase of potentiation of EPP amplitude, whereas an intracellular electrode that records the activity of the whole

nmj would still detect both phases since the non-injected PSCs of the nmj (on average 4 per nmj) would present the normal Ca^{2+} response induced by tg.

We first tested whether the tg effects could be detected similarly by the focal and the intracellular electrodes. Simultaneous intracellular and focal recordings were performed following injection of PSCs with the vehicle solution (K^+ acetate and Ca^{2+} -green -1 dextran) before and during bath application of tg (2 μM). As shown in Figure 6B, identical effects were monitored by the intracellular and the focal recordings ($N=3$, $n = 3$). This indicates that the focal recordings reliably detect the effect of tg on transmitter release and that changes occurring in synaptic efficacy caused by BAPTA injection into PSCs should be detected.

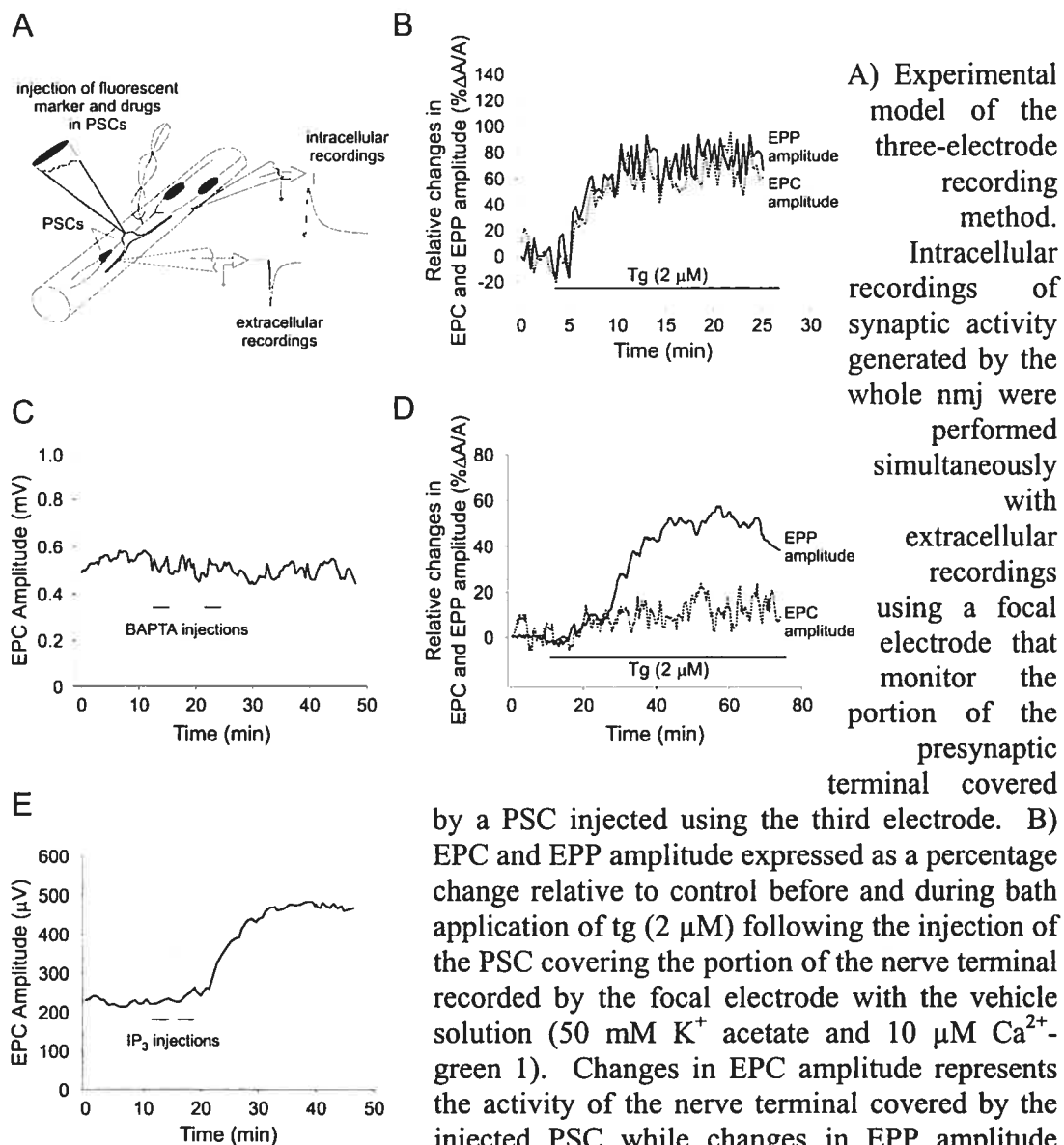
We next examined whether BAPTA injection (10 mM in the electrode) in PSCs would have any effects on transmitter release. As shown in Figure 6C, injection of BAPTA in PSCs did not affect the amplitude of focally recorded end-plate currents (EPCs) evoked at 0.2 Hz ($650 \pm 120 \mu\text{V}$ in control and $635 \pm 112 \mu\text{V}$ after BAPTA injection; $p > 0.05$, Student paired t-test; $N=6$, $n=6$). This result is consistent with the observation that Ca^{2+} stores in PSCs are loaded at rest and that the release of Ca^{2+} from internal stores is triggered by higher frequencies of transmitter release (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Bourque and Robitaille, 1998).

Following bath application of tg (2 μM), the intracellular electrode that monitored the activity of the whole nmj recorded the typical changes in EPP amplitude, that is, a rapid increase followed by a slower and transient rise indicating that tg had its full effects on synaptic transmission. However, the synaptic responses recorded by the focal electrode that originated from the portion of the nerve terminal covered by the PSC injected with BAPTA only showed a rapid and sustained

potentiation of synaptic transmission (Figure 6D). These results indicate that preventing a rise of Ca^{2+} in PSCs partially occluded tg-induced potentiation of synaptic transmission. In 4 experiments, the increase in EPC amplitude recorded by the focal electrode was only $22 \pm 8\%$ of control in comparison to $75 \pm 11\%$ increase in EPP amplitude recorded by the intracellular electrode ($N=4$, $n=4$). The rise in EPC amplitude reflecting changes in the nerve terminal covered by the injected PSC (i.e. recorded by the focal electrode) was significantly smaller ($P = 0.01$, Student paired t -test) than the rise recorded by the intracellular electrode (activity from the whole nmj). This shows that the period of peak amplitude was completely abolished at the portion of the nerve terminal covered by the PSC injected with BAPTA.

It is believed that internal stores in PSCs are regulated by an IP_3 receptor (Robitaille, 1995; Castonguay et al., 2000b). Hence, injection of IP_3 in PSCs should cause a Ca^{2+} transient and induce a rise in transmitter release. As shown in Figure 6E, injection of IP_3 (10 mM in the electrode) produced an average increase in EPC amplitude of $68 \pm 12\%$ ($N=4$, $n = 4$). Hence, specific and direct activation of glial IP_3 receptors leading to Ca^{2+} release from internal stores resulted in a potentiation of transmitter release.

Figure 6 Potentiation of synaptic transmission by PSCs



represent changes occurring at the whole nmj. Note that tg induced a similar increase in EPP amplitude (whole nmj activity) and in EPC amplitude (portion of the terminal covered by the injected PSC). **C)** EPC amplitude recorded by a focal electrode located near the portion of a nerve terminal covered by a PSC before, during and after the injection of BAPTA (10 mM in the electrode) in the PSC. EPCs were evoked by nerve stimulation at 0.2 Hz. Note that BAPTA injection had no effect on synaptic transmission. **D)** EPC and EPP amplitude expressed as a percentage change relative to control before and during bath application of tg ($2\ \mu\text{M}$) following the injection of BAPTA (10 mM in the electrode) in the PSC covering the portion of the nerve terminal recorded by the focal electrode. Note that tg induced a rapid rise followed by a second, slower increase in EPP amplitude (whole nmj activity) but only induced

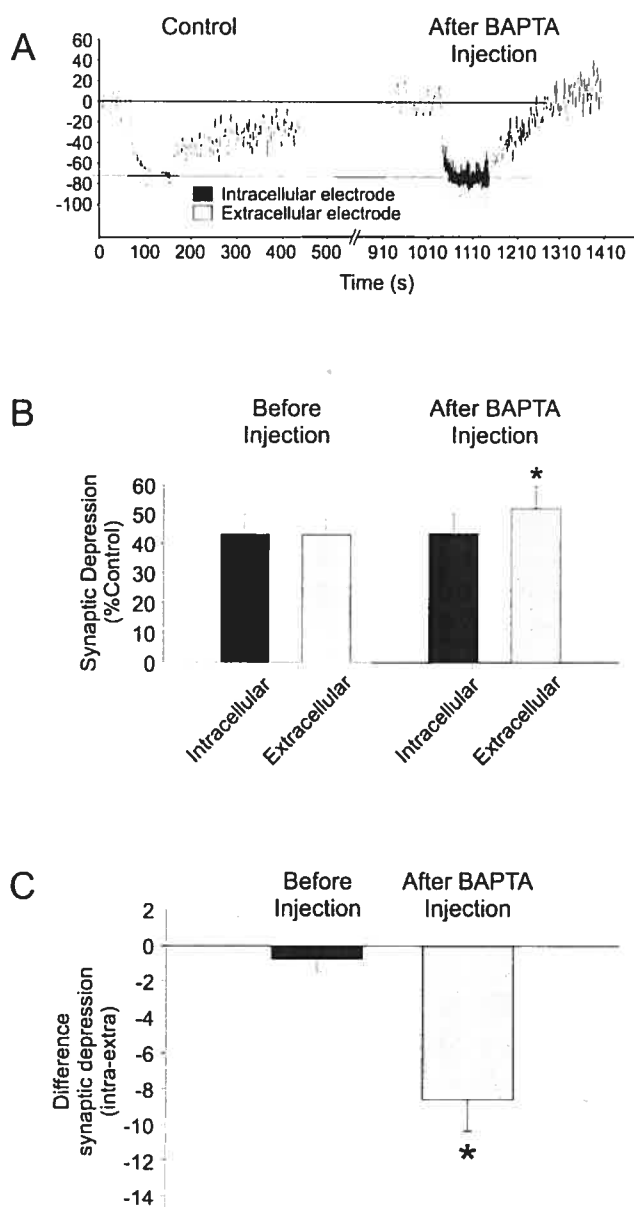
a small and rapid rise in EPC amplitude (portion of the terminal covered by the injected PSC). E) EPC amplitude before and after injection of IP_3 (10 mM in the electrode) in the PSC covering the portion of the nerve terminal recorded by the focal electrode. EPCs were evoked by motor nerve stimulation at 0.2 Hz. Note that the injection of IP_3 in PSCs potentiated transmitter release.

PSCs Modulates Synaptic Depression at the Frog NMJ

Knowing that high frequency activity at the frog nmj induced a Ca^{2+} elevation in PSCs, we tested whether a component of synaptic plasticity was modulated by PSCs under physiological conditions. A high frequency depression was induced by stimulating the motor nerve of the preparation while synaptic activity was simultaneously monitored by an intracellular and a focal electrode, as described above. No differences were observed between the level of control depression recorded by the intracellular and focal electrodes (respectively 48.8 ± 3.9 and 49.1 ± 3.5 mV; $N=6$, $n=6$, $P = 0.720$, Student t-test; Figure 7A). Moreover, depressions could be repeatedly elicited without changes in their amplitude (data not shown). Following a 15 min recovery period (break in X axis, Figure 7A), BAPTA was injected in the PSC covering the branch of the nmj recorded by the focal electrode and a second depression was induced. After BAPTA injection into the PSC, the depression recorded by the focal electrode was significantly greater than the depression recorded by the intracellular electrode (respectively 58.1 ± 3.8 and 48.8 ± 3.1 mV; $P = 0.0007$, Student t-test). Furthermore, the difference between the focal and intracellular depression in control (-0.9 ± -0.7 mV) and after BAPTA injection (-10.0 ± -1.2 mV) were significantly different ($P = 0.003$, Student paired t-test; Figure 7B, C). These results indicate that PSCs can efficiently modulate synaptic

transmission under physiological conditions, during high frequency activity. The more pronounced depression following BAPTA injection in PSCs is consistent with the fact that Ca^{2+} elevation in PSCs potentiated transmitter release.

Figure 7 *Synaptic depression is modulated by PSCs*



A) Changes in EPC (gray trace) amplitude and EPP (black trace) amplitude following induction of high frequency depression (10 Hz/80 s) at the frog nmj. Note that the focal and intracellular recordings show the same amplitude of depression. After injection of BAPTA into a PSC (break in X axis), the focal electrode (gray trace), that records synaptic transmission under the injected PSC shows a bigger depression than the intracellular one, thus suggesting that the presence of BAPTA in PSC blocked their potentiating effect on synaptic transmission. B) Synaptic depression relative to control level for intracellular and extracellular recordings before and after BAPTA injection into PSCs. Note that after BAPTA injection, depression detected by the focal electrode was significantly greater. C) Difference between intracellular and extracellular

depression, in control and after BAPTA injection into PSCs. Note that after BAPTA injection, the difference between the amplitude of depression recorded by the intracellular and focal electrodes was significantly greater.

2.2.5 Discussion

In this study, the differential modulation of transmitter release by presynaptic and glial internal stores has been investigated. The blockade of the ATPase pump of presynaptic internal stores reduced the clearance of cytoplasmic Ca^{2+} which resulted in a potentiation of transmitter release. A rise in intracellular Ca^{2+} in PSCs by either blocking the ATPase pump or inducing Ca^{2+} release by IP_3 injection also potentiated transmitter release. Moreover, synaptic depression was more pronounced following BAPTA injection in PSCs. These results demonstrate that, besides the presynaptic element, there is an important Ca^{2+} -dependent component of glial activation that intervenes in the regulation of synaptic efficacy.

Presynaptic Ca^{2+} Stores Participate in Ca^{2+} Clearance

The blockade of the ATPase pump by tg lead to a prolonged duration of Ca^{2+} responses elicited by single action potentials and to a rapid and sustained rise in EPP amplitude and MEPP frequency. The presynaptic effect of tg were stable over time as indicated by the differential occlusion of the slow component of tg effects on transmitter release following BAPTA injection in PSCs. In addition, the regulation of MEPP frequency appears activity-dependent since no effect of tg were observed in absence of nerve activity. This is consistent with the results of Narita et al. (1998) who reported an activity dependent CICR regulation of transmitter release.

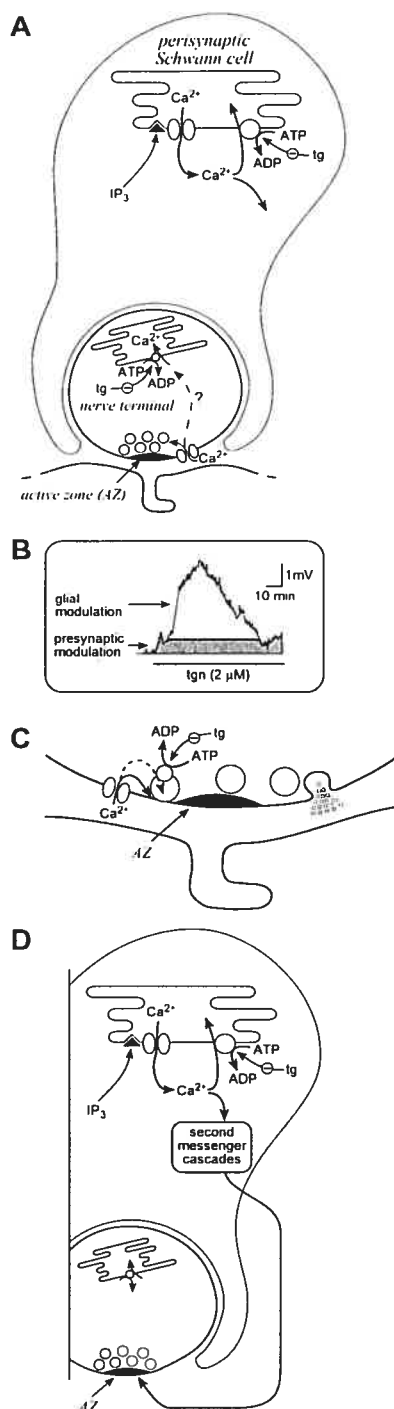
Our results indicate that the presynaptic Ca^{2+} stores are empty at rest since tg had no effect on resting nerve terminals while it induced a transient Ca^{2+} rise in PSCs in the same conditions. Therefore, enhancement of transmitter release cannot be

accounted for by a rise in overall presynaptic resting Ca^{2+} following depletion of nerve terminal internal stores. Rather, our data suggest that the increase in transmitter release is due to a local accumulation of resting Ca^{2+} following evoked synaptic activity. Indeed, the sustained rise in spontaneous release suggests that a local increase in resting Ca^{2+} occurred near release site, even though no rise in overall resting Ca^{2+} was detected during continuous, low frequency stimulation. However, a Ca^{2+} rise in the whole nerve terminal was observed as a consequence of prolonged stimulation at higher frequency. The lack of effect of tg on facilitation is consistent with the absence of rise in resting Ca^{2+} and might suggest that the local rise in resting Ca^{2+} that occurred near release sites, as suggested by the rise in MEPP frequency, was too low to affect the facilitation process.

Our results further suggest that presynaptic ATPase Ca^{2+} pump regulates the level of cytoplasmic Ca^{2+} ions following their entry elicited by presynaptic activity. ATPase pumps are generally associated with the smooth endoplasmic reticulum (SER; Lytton et al., 1992; Poulsen et al., 1995; Fierro et al., 1998), located away ($\sim 1 \mu\text{m}$) from release sites. This suggests that the prolongation in the duration of Ca^{2+} responses elicited by single action potentials would be caused by a reduced capacity to buffer Ca^{2+} ions escaping the active zones where Ca^{2+} channels are clustered (Blaustein et al., 1978; Robitaille et al., 1990; Cohen et al., 1991) and where Ca^{2+} concentration is high (Adler et al., 1991; Augustine et al., 1991). However, this possibility is difficult to reconcile with our observation that MEPP frequency was increased without a rise in resting fluorescence which suggest that the elevation of resting Ca^{2+} must be spatially restricted around active zones. Moreover, the concentration of Ca^{2+} is quickly controlled and drops exponentially outside the mouth

of Ca^{2+} channels, extruded by the Ca^{2+} pumps and various Ca^{2+} exchangers (Llinas, 1992; Smith and Augustine, 1988; Adler et al., 1991; Stanley, 1997). Hence, a necessary alternative is that tg-sensitive Ca^{2+} pumps should be localized near release sites. One possibility might be that the ATPase pumps are located in the membrane of synaptic vesicles since these organelles are located near active zones (Figure 8) and could buffer and release Ca^{2+} within the active zone region (Grohovaz et al., 1996; Fossier et al., 1999; Lysakowski et al., 1999). This possibility is further supported by recent observations at the frog nmj (Narita et al., 2000; Soga et al., 2000) where synaptic vesicles appear essential in CICR regulation of transmitter release.

Figure 8 *Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial internal stores*



A) Diagram of a cross section of a presynaptic nerve terminal covered by a perisynaptic Schwann cells (PSC). In the presynaptic terminal, blockade of the ATPase pump with tg lead to a reduction in clearance of Ca^{2+} while it resulted in a release of Ca^{2+} from the internal stores of PSCs. The release of Ca^{2+} from PSCs internal stores is regulated by IP_3 receptors. B) Schematic representation depicting the relative contribution of the presynaptic and the glial components of tg effects on transmitter release. C) Proposed functional model of the ATPase pump of internal stores of presynaptic terminals based on the results presented in this study. According to the dynamic of Ca^{2+} entry and handling around an active zone in the nerve terminal, and the local changes in presynaptic resting Ca^{2+} level produced by tg, we propose that the ATPase pump is located in the membrane of synaptic vesicles located around release sites. They are located in a zone (Grey zone, ~50 nm) in which the regulation of Ca^{2+} dynamics will likely affect transmitter release. Hence, this suggests that synaptic vesicles might act as an auto-regulatory mechanism in transmitter release. D) Proposed model of the Ca^{2+} -dependent glial regulation of transmitter release. Because the duration of the PSC-dependent regulation of transmitter release by tg outlasts by several tens of minutes the duration of the resultant rise in intracellular Ca^{2+} , we propose that the PSC regulation is mediated by the Ca^{2+} -dependent production of neuromodulatory glial factors. Hence, as a consequence of synaptic activity, glial receptors would be activated triggering IP_3 production by phospholipase C which would result in the release of Ca^{2+} from internal stores. This Ca^{2+} would then be partially pumped back into the stores by the ATPase but

would also activate Ca^{2+} -dependent second messenger cascades that would lead to the production of membrane permeant neuromodulatory substances that would reach the presynaptic nerve terminal to regulate the release machinery.

Regulation of Transmitter Release by PSCs Ca^{2+} Stores

PSCs Ca^{2+} stores are filled at rest (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995) and display a Ca^{2+} elevation upon activation by ACh and ATP released by the nerve terminal during synaptic activity (Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997). Our results further suggest that the activation of PSCs receptors lead to the production of IP_3 and activation of IP_3 receptors on internal stores. Hence, it appears that the internal stores of Ca^{2+} in PSCs serve as a signalling system in reaction to high frequency synaptic activity (Figures 6, 7). This frequency-dependence is confirmed by our observation that BAPTA injection in PSCs had no effect on synaptic transmission during low level of synaptic activity (Figure 6C).

Ca^{2+} release from PSCs internal stores potentiates transmitter release since BAPTA injection in PSCs occluded the transient increase of transmitter release produced by tg, and IP_3 injection in PSCs induced a potentiation of transmitter release. It is unlikely that the potentiation of transmitter release results from the direct extrusion of Ca^{2+} from PSCs and accumulation around the nerve terminal. Indeed, the time course of tg-induced glial effects on transmitter release persists for about 45 min after the rise in Ca^{2+} in PSCs has terminated. Rather, the time course of the effects strongly suggests that the glial-mediated effects on synaptic transmission are initiated by second messenger cascades producing neuroregulatory substances (Figure 8). Interesting candidates for such an action are prostaglandins since they are known to potentiate transmitter release of the amphibian nmj (Madden and Van der Kloot, 1985) and the synthesizing enzyme is present in PSCs (Pappas et al., 1999).

However, the presynaptic mechanisms targeted by this glial modulation remain unknown.

Interestingly, glial internal stores appear regulated by IP₃ receptors (this study; Araque et al., 1998, 1999; Bezzi et al., 1998) while presynaptic internal stores are preferentially associated with ryanodine receptors and controlled by CICR mechanisms (Peng, 1996; Smith and Cunnane, 1996; Lin et al., 1998; Schwartz et al., 1999; Krizaj et al., 1999). This is consistent with the mode of activation of glial and presynaptic compartments where PSCs, and glial cells in general, are activated by neurotransmitters via G-protein-coupled receptors production while presynaptic internal stores are regulated by the main event triggering release, that is, the entry of Ca²⁺. Hence, these data indicate that synaptic efficacy is differentially regulated by the IP₃ driven glial stores and by the presynaptic CICR mechanisms.

Glial Cells as Balanced Feed-Back Modulators of Synaptic Efficacy

The present findings further support the concept that perisynaptic glial cells play an active role in regulating synaptic transmission (Newman and Zahs, 1998; Kang et al., 1998; Robitaille, 1998; Araque et al., 1999; Castonguay et al., 2000a). Indeed, during high frequency depression, BAPTA injection into PSCs prevented glial Ca²⁺-dependent potentiation, which resulted in a more pronounced synaptic depression. Moreover, it was shown at the nmj that PSCs contribute to the production of synaptic depression and, hence, are involved in a feedback, regulatory synapse-glia-synapse loop (Robitaille, 1998). According to these observations and the data presented here, it appears that PSCs at the amphibian nmj can potentiate as well as depress transmitter release. The difference in the results obtained by

Robitaille (1998) and in the present study are likely due to the cellular mechanisms targeted in the different experiments. Indeed, the involvement of PSCs in the regulation of synaptic efficacy was tested by interfering with G-protein activity (Robitaille, 1998) which has a large spectrum of effects since almost all PSCs activities are regulated via this mechanism (Jahromi et al., 1992; Georgiou et al., 1994; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997). Hence, a large number of events must have been perturbed in addition to Ca^{2+} regulation, which is the only element affected in the present study.

It appears that PSCs can increase and decrease the efficacy of the synapse using different cellular mechanisms where PSC-mediated potentiation of transmitter release would occur in a Ca^{2+} -dependent manner whereas the depression would be Ca^{2+} -independent and based on other second messenger cascades. Alternatively, since an elevation of Ca^{2+} from PSCs internal stores occurs during the glial-mediated potentiation and depression, a possibility is that the differential activation of PSCs may depend on the concentration and time course of the Ca^{2+} increase. Furthermore, the size and duration of Ca^{2+} responses in PSCs are graded with the level of transmitter release as suggested by the frequency-dependence of the glial Ca^{2+} responses (Jahromi et al., 1992). Hence, the balance between glial depression and potentiation may reside in the different patterns of Ca^{2+} elevation observed in different synaptic conditions. A similar mechanism has been reported for the selective production of long term potentiation and depression in hippocampal neurons (Yang et al., 1999).

The evidence that PSCs can potentiate and depress transmitter release indicate that glial cells have the potential to adjust to the efficacy of the synapse

according to its level of activity. This would provide perisynaptic glial cells with a unique feature to balance the efficacy of the synaptic elements in a local synapse-glia dynamic feed-back loop.

2.2.6 Reference list

- Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 11: 1496-1507.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *TINS* 22: 208-215.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 6822-6829.
- Augustine GJ, Adler EM, Charlton MP (1991) The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann NY Acad Sci* 633: 365-381.
- Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1987) Calcium action in synaptic transmitter release. *Ann Rev Neurosci* 10: 633-693.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependant glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Blaustein MP, Ratzlaff RW, Schweitzer ES (1978) Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. II Kinetic properties of the nonmitochondrial Ca^{2+} sequestration mechanism. *J Gen Physiol* 72: 43-66
- Bourque M-J, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 512: 197-209.
- Cao Yj, Peng YY (1999) Caffeine and carbonyl cyanide m-cyclophenylhydrazone increases evoked and spontaneous release of luteinizing hormone-releasing hormone from intact presynaptic terminals. *Neurosci* 92: 1511-1121.
- Carmignoto G, Pasti L, Pozzan T (1998) On the role of voltage-dependant calcium channels in calcium signalling of astrocytes in situ. *J Neurosci* 18: 4637-4645.
- Castonguay A, Lévesque S, Robitaille R (2000a) Glial cells as active partners in synaptic function. *Progress brain res.* In press
- Castonguay A, Vallée J, Robitaille R (2000b) Mobilization of internal Ca^{2+} stores of PSCs by IP_3 receptors potentiates transmitter release at the frog neuromuscular synapse. *Soc Neurosci Abstr* 26: 86.

- Cohen MW, Jones OT, Angelides KJ (1991) Distribution of Ca^{2+} channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent omega-conotoxin. *J Neurosci* 11(4): 1032-1039.
- Fierro L, DiPolo R, Llano I (1998) Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. *J Physiol (Lond)* 510: 499-512.
- Fossier P, Diebler MF, Mothet JP, Israel M, Tauc L, Baux G (1998) Control of the calcium concentration involved in acetylcholine release and its facilitation: an additional role for synaptic vesicles? *Neuroscience* 85: 85-91.
- Fossier P, Tauc L, Baux G (1999) Calcium transients and neurotransmitter release at an identified synapse. *TINS* 22: 161-166.
- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12: 443-455.
- Grohovaz F, Bossi m, Pezzati R, Meldolesi J, Torri Tarelli F (1996) High resolution ultrastructural mapping of total calcium: Electron spectroscopic imaging/ Electron energy loss spectroscopy analysis of a physically / chemically processed nerve-muscle preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4799-4803.
- Guo X, Przywara DA, Wakade TD, Wakade AR (1996) Exocytosis coupled to mobilization of intracellular calcium by muscarine and caffeine in rat chromaffin cells. *J Neurochem* 67: 155-162.
- He X, Yang F, Xie Z, Lu B (2000) Intracellular Ca^{2+} and calmodulin-dependant kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *J Cell Biol* 149: 783-792.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8: 1069-1077.
- Kamiya H, Zucker RS (1994) Residual Ca^{2+} and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371: 603-606X.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neurosci* 1: 683-692.
- Ko CP (1987) A lectin, peanut agglutinin, as a probe for the extracellular matrix in living neuromuscular junctions. *J Neurocytol* 16: 567-576.
- Krizaj D, Bao JX, Schmitz Y, Witkovsky P, Copenhagen DR (1999) Caffeine-sensitive calcium stores regulate synaptic transmission from retinal rod photoreceptors. *J Neurosci* 19: 7249-7261.

- Li XY, Zhang Y, Lester HA, Schuman EM Davidson N (1998) Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 10231-10240.
- Lin YQ, Brain KL, Bennett MR (1998) Calcium in sympathetic boutons of rat superior cervical ganglion during facilitation, augmentation and potentialisation. *J Auton Nerv Syst* 73: 26-37.
- Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256: 677-679.
- Lysakowski A, Figueras H, Price SD, Peng YY (1999) Dense-cored vesicles, smooth endoplasmic reticulum, and mitochondria are closely associated with non-specialized parts of plasma membrane of nerve terminals: implications for exocytosis and calcium buffering by intraterminal organelles. *J Comp Neurol* 403: 378-390.
- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267: 14483-14489.
- Madden KS, Van der Kloot W (1985) Indomethacin, prostaglandin E2 and transmission at the frog neuromuscular junction. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 305-314.
- Narita K, Hachisuka J, Soga S, Akita T, Shirasaki T, Kuba K (2000) The mechanism of the priming of ryanodine receptors for activation at frog motor nerve terminals. *Soc Neurosci Abstr* 26 : 86
- Narita K, Akita T, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K (1998) A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism involved in asynchronous exocytosis at frog motor nerve terminals. *J Gen Physiol* 112: 593-609.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18: 4022-4028.
- Pappas D, Hazrati LN, Robitaille R (1999) Arachidonic acid and PGE2 as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. *Soc Neurosci Abstr* 25: 1256.
- Peng Y (1996) Ryanodine-sensitive component of calcium transients evoked by nerve firing at presynaptic nerve terminals. *J Neurosci* 16: 6703-6712.
- Peng YY (1998) Effects of mitochondrion on calcium transients at intact presynaptic terminals depend on frequency of nerve firing. *J Neurophysiol* 80: 186-195.

- Poulsen JC, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell RE, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K, Treiman M (1995) Thapsigargin-sensitive Ca^{2+} -ATPases account for Ca^{2+} uptake to inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in adrenal chromaffin cells. *Biochem J* 307 (Pt 3): 749-758.
- Rasmussen U, Broogger CS, Sandberg F (1978) Thapsigargin and thapsigarginine, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm Suec* 15: 133-140.
- Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15: 7121-7131.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21: 847-855.
- Robitaille R, Alder EM, Charlton MP (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5: 773-779.
- Robitaille R. and Charlton M.P. (1992) Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci*. 1992 12: 297-305.
- Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 504: 337-347.
- Schwartz AD, Whitacre CL, Wilson DF (1999) Do ryanodine receptors regulate transmitter release at the neuromuscular junction of rat? *Neurosci Lett* 274: 163-166.
- Smith AB, Cunnane TC (1996) Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic terminals of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 497: 657-664.
- Smith SJ, Augustine GJ (1988) Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *TINS* 11: 458-464.
- Soga S, Akita T, Hachiuka J, Narita K, Akasu T, Kuba K (2000) The mode of coupling of ryanodine receptors to Ca^{2+} channels at frog motor nerve terminals. *Soc Neurosci Abstr* 26: 86.
- Stanley EF (1997) The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *TINS* 20: 404-409.
- Tang Y, Zucker RS (1997) Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron* 18: 483-491.

- Tse A, Tse FW (1998) alpha-adrenergic stimulation of cytosolic Ca^{2+} oscillation and exocytosis in identified rat corticotrophs. *J Physiol (Lond)* 512: 385-393.
- Tse FW, Tse A, Hille B, Horstmann H, Almers W (1997) Local Ca^{2+} release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron* 18: 121-132.
- Yang SN, Tang YG, Zucker RS (1999) Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. *J Neurophysiol* 81: 781-787.
- Zucker RS (1993b) Calcium and transmitter release at nerve terminals. *Biochem Soc Trans* 21: 395-401X.
- Zucker RS (1993a) Calcium and transmitter release. *J Physiol (Paris)* 87: 25-36X.

2.3 Discussion du chapitre deuxième

Il avait déjà été montré par Robitaille (1998) que l'activation du métabolisme des protéines G des CSPs induit une dépression de la transmission synaptique. Le présent article montre que les CSPs sont en mesure de jouer le rôle complémentaire, c'est-à-dire potentialiser l'efficacité de la synapse. Les CSPs sont donc à même de produire des effets radicalement opposés au niveau de l'efficacité synaptique, selon leur état d'activation, qui est sous-tendu par les différents patrons d'activité rencontrés à la synapse même.

Les résultats montrés ici indiquent clairement que la libération du contenu des réserves calciques gliales induit une potentialisation de la transmission synaptique. Or, dans son étude de 1998, Robitaille a induit une diminution de l'efficacité synaptique par l'activation non-sélective des protéines G des CSPs. Cette façon de faire ne provoque pas seulement une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs. En effet, un grand nombre des récepteurs retrouvés au niveau des CSPs sont couplés à des protéines G (mAChR, adénosine, purinergique, peptidergique). Ainsi, en plus de provoquer une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs (via l' IP_3), l'activation non-spécifique des protéines G des CSPs a pu entraîner la production d'autres messagers seconds gliaux, par exemple le NO, qui induit une dépression synaptique et dont l'enzyme de synthèse est présente à la JNM de grenouille.

L'effet final des CSPs semble donc être le résultat de la somme des influences potentialisatrices et inhibitrices de ces cellules sur l'efficacité de la synapse. L'effet observé consisterait en la manifestation de la voie potentialisatrice et/ou inhibitrice la plus fortement activée par le patron d'activité synaptique rencontré par la synapse.

Contrairement aux réserves calciques gliales, les réserves calciques présynaptiques ne sont pas chargées de Ca^{2+} en condition d'activité à basse fréquence (0.2 Hz). Ces dernières semblent donc être impliquées dans le maintien du niveau calcique de base des terminaisons nerveuses. Lors d'une bouffée d'activité, les terminaisons sont envahies par le Ca^{2+} extracellulaire, suite à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Les réserves calciques présynaptiques contribueraient alors à rétablir le niveau basal de Ca^{2+} des terminaisons, grâce à l'activité des pompes Ca^{2+} -ATPases présentes à sa surface.

2.4 Conclusion du chapitre deuxième

Cet article ajoute à notre compréhension des rôles distincts des réserves calciques présynaptiques et gliales au niveau de la TS. Alors que les réserves calciques gliales sont remplies en condition de repos, afin de servir d'élément de signalisation, les réserves présynaptiques sont vides au repos, afin de servir de tampon calcique suite à l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire, se produisant suite à l'activité synaptique.

De plus, une nouvelle perspective est ajoutée au rôle des CSPs à la JNM : en effet, ces cellules peuvent non-seulement diminuer mais aussi potentialiser l'efficacité de la synapse. Cette versatilité de leur pouvoir d'action leur confère un rôle intégratif complexe dans la plasticité de la synapse neuromusculaire.

2.5 Bibliographie du chapitre deuxième

- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10: 2129-2142.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* 18: 6822-6829.
- Etcheberrigaray R, Fiedler JL, Pollard HB, Rojas E (1991) Endoplasmic reticulum as a source of Ca^{2+} in neurotransmitter secretion. *Annals New York Academy of Sciences* 635: 90-99.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8: 1069-1077.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1: 683-692.
- Martin ED, Buno W (2003) Caffeine-mediated presynaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 89: 3029-3038.
- Narita K, Akita t, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K (1998) A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} Release Mechanism Involved in Asynchronous Exocytosis at Frog Motor Nerve Terminals. *The Journal of General Physiology* 112: 593-609.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18: 4022-4028.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744-747.
- Rasmussen U, Broogger CS, Sandberg F (1978) Thapsigargin and thapsigarginic acid, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm Suec* 15: 133-140.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21: 847-855.
- Tang Y, Zucker RS (1997) Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron* 18: 483-491.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2466-2470.

3 Chapitre troisième

***La Xestospongine C, un inhibiteur du récepteur à l'IP₃,
interagit avec le fonctionnement de la pompe Ca²⁺-ATPase
des réserves calciques de la JNM d'amphibien in situ***

3.1 Introduction

À la JNM de grenouille *Rana pipiens*, il a été montré que les réserves calciques présynaptiques sont sous le contrôle de récepteurs à la ryanodine et sont fonctionnellement impliquées dans le phénomène de largage calcique induit par le Ca^{2+} (CICR; Narita et al., 1998). Ces récepteurs sont également présents au niveau des fibres musculaires où ils sont responsables du relâchement du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique suite à la propagation du potentiel d'action au niveau des tubules T (Brunder et al., 1992). Quant à elles, les réserves calciques gliales sont sous le contrôle des récepteurs à l' IP_3 de type 2 (Castonguay et Robitaille, 2002). En effet, suite à l'injection spécifique d' IP_3 à l'intérieur des CSPs, on observe une élévation de leur $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tel que décrit au chapitre deuxième (Castonguay et Robitaille, 2001).

Puisque dans notre préparation les récepteurs à l' IP_3 semblent confinés aux CSPs, l'utilisation d'un bloqueur spécifique des ces récepteurs pourrait s'avérer d'une grande utilité afin de manipuler le métabolisme calcique des CSPs et d'étudier ses effets au niveau des différents aspects de la plasticité de la JNM. Or, le choix d'un bloqueur spécifique pour les récepteurs à l' IP_3 est compliqué par les effets non-spécifiques de ceux-ci et par le fait que certaines de ces substances ne sont pas perméables aux membranes. Par exemple, des évidences montrent que l'héparine, en plus de bloquer les récepteurs à l' IP_3 , peut modifier le couplage des récepteurs membranaires et les protéines G (Dasso et Taylor, 1991). De son côté, le 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB), bloque non-seulement les récepteurs à l' IP_3 ,

mais aussi les pompes calciques intracellulaires, causant ainsi une élévation calcique intracellulaire provenant des réserves cellulaires internes (non-mitochondriales) (Missiaen et al., 2001). D'autres évidences viennent compliquer l'utilisation du 2-APB et montrent qu'un autre de ses effets est d'antagoniser l'entrée de Ca^{2+} plutôt que d'inhiber la relâche des réserves sous le contrôle de l' IP_3 (Botman et al., 2002). L'utilisation du decavanadate est elle aussi problématique puisque cette substance, instable en solution, se décompose pour libérer des sous-produits pouvant interagir avec la pompe Ca^{2+} -ATPase (SERCA) des réserves intracellulaires (Aureliano et Mdeira, 1994).

Ainsi, à cause de leur manque de spécificité envers les récepteurs à l' IP_3 , les différents bloqueurs connus de ces récepteurs ne pouvaient être utilisés au niveau de notre préparation *in situ*, puisqu'ils auraient potentiellement eu des effets au niveau du fonctionnement d'autres composantes cellulaires, rendant toute discrimination d'effets spécifiques au blocage du récepteur à l' IP_3 impossibles.

Or, la découverte d'une nouvelle classe d'inhibiteurs des récepteurs à l' IP_3 , les xestospongines, perméables aux membranes et ayant une grande sélectivité d'action envers les récepteurs à l' IP_3 , semblait rendre possible leur utilisation au niveau de notre préparation (Gafni et al., 1997).

Cependant, leur spécificité a été remise en question par De Smet et ses collaborateurs (De Smet et al., 1999). Ceux-ci ont en effet montré que la xestospongine C (XeC; le composé le plus actif de la famille des xestospongines) pouvait bloquer la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique de la préparation de cellules musculaires lisses A7r5 perméabilisées.

Devant ces résultats, nous avons voulu vérifier la spécificité d'action de la XeC envers les récepteurs à l'IP₃ de notre préparation avant d'utiliser celle-ci pour interférer de façon spécifique avec les réserves calciques des CSPs.

En premier lieu, nous avons confirmé la présence des récepteurs à l'IP₃ au niveau de notre préparation. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'immunohistochimie et révélé la présence des récepteurs par des anticorps couplés à des fluorophores, visualisés à l'aide d'un microscope confocal.

Dans un deuxième temps, nous avons montré qu'après une exposition de 10 minutes à la XeC, l'application locale de divers agonistes (ATP, muscarine, adénosine) n'induisait pas de réponses calciques, cependant, ce n'était le cas que lorsque les réserves avaient été vidées par une application préalable d'agonistes ou une stimulation nerveuse et ce, juste avant l'application de XeC dans le bain.

D'autre part, nous avons montré que l'application de XeC dans le bain (30 minutes) induit une élévation initiale de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs. Ensuite, après 30 minutes d'incubation, la XeC prévient les réponses calciques, qu'elles soient induites par la stimulation du nerf moteur de la préparation ou par l'application locale d'agonistes.

Finalement, l'application de XeC sur la préparation (20 minutes) bloque complètement les effets de la TG (un inhibiteur des pompes Ca^{2+} -ATPase des réserves intracellulaires, qui induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$) au niveau des CSPs. En effet, au niveau des terminaisons nerveuses, l'application de XeC prolonge de façon significative le temps d'évacuation du Ca^{2+} entré suite à l'arrivée d'un potentiel d'action. Aucun effet additionnel de la TG n'a été mis en évidence lorsque

celle-ci est ajoutée dans le bain avec la XeC. Inversement, lorsque la TG est appliquée en premier dans le bain, on note les mêmes effets au niveau du temps d'évacuation du calcium des terminaison présynaptiques et l'ajout subséquent de la XeC avec la TG n'entraîne aucun changement dans le déroulement temporel des réponses calciques enregistrées. Ces résultats portent à croire que ces deux substances perturbent de façon similaire le fonctionnement des réserves calciques présynaptiques.

Dans les pages qui suivent, le lecteur trouvera le texte intégral de l'article relatant ces résultats, paru dans la revue *Cell Calcium* en juillet 2002

Référence complète : Castonguay A et Robitaille R. Xestospongine C is a potent inhibitor of SERCA at a vertebrate synapse. *Cell Calcium*. 2002 Jul.;32(1):39-47.

© Cell Calcium, 2002. Reproduit avec la permission de Elsevier.

Lien : http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6WCC-468TDB1-5-2F&_cdi=6735&_orig=search&_coverDate=07%2F31%2F2002&_qd=1&_sk=999679998&_view=c&_wchp=dGLbVtz-zSkzk&_acct=C000043357&_version=1&_userid=789722&md5=e2f2fc92e291de80699db584e2350565&ie=f.pdf

Contribution de l'étudiante : L'étudiante a effectué les expériences, leur analyse, l'interprétation des données et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Robitaille.

3.2 Article du chapitre troisième

XESTOSPONGIN C IS A POTENT INHIBITOR OF SERCA AT A VERTEBRATE SYNAPSE

Annie Castonguay and Richard Robitaille*
Centre de Recherche en Sciences Neurologiques
and
Département de physiologie
Université de Montréal
Montréal, Canada
H3C 3J7

* to whom correspondence should be sent

Addresses:

Richard Robitaille
Département de physiologie
Université de Montréal
P.O. Box 6128, station "Centre-Ville"
Montréal, Canada
H3C 3J7
Tel #: (514) 343-6111, ext 1946
Fax #: (514) 343-2111
e-mail:
[REDACTED]

Annie Castonguay
Département de physiologie
Université de Montréal
P.O. Box 6128, station "Centre-Ville"
Montréal, Canada
H3C 3J7
Tel #: (514) 343-6111, ext 1275
Fax #: (514) 343-2111
e-mail:
[REDACTED]

Acknowledgements

The authors wish to thank Joanne Vallée for her help with immunohistochemistry experiments and Dominique Nouel for her technical expertise with confocal microscopy. The authors also wish to thank Dr C.P. Ko (USC), for kindly providing the 2A12 antibody. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR; Grant MT 14137), Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR; Team grant 00ER2119) and by an award from the EJLB Foundation to R.R. A.C. was supported by a CIHR doctoral award studentship. R.R. was a CIHR Investigator.

3.2.1 Summary

The specificity of action of Xestospongine C (XeC) towards the IP₃ receptor has been studied using the frog neuromuscular junction. In perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at this synapse, Ca²⁺ stores are dependent upon IP₃ activation. Bath application of XeC (700 nM) caused a transient calcium elevation and blocked Ca²⁺ responses evoked in PSCs by synaptic activity or various agonists (ATP, muscarine, adenosine) only when Ca²⁺ stores had previously been challenged with local application of agonists. Moreover, XeC occluded the effects of thapsigargin (tg; 2 µM), a blocker of the ATPase Ca²⁺ pump of internal stores, which failed to evoke Ca²⁺ transients following 20 min of exposure to XeC. In nerve terminals, where the Ca²⁺ stores are ryanodine-sensitive, application of XeC (700 nM) prolonged the recovery phase of Ca²⁺ transients evoked by single action potentials, due to a prolonged Ca²⁺ clearance in the nerve terminal. No effects of tg (2 µM) were observed on Ca²⁺ response evoked by nerve stimulation when applied on the preparation after XeC (700 nM). Conversely, XeC (700 nM) had no effect on the shape and duration of Ca²⁺ entry in nerve terminals when tg was applied before XeC. These results indicate that XeC acts as an inhibitor of the SERCA pump of internal stores.

Key Words: Xestospongine C, Thapsigargin, Perisynaptic Schwann cells; SERCA; calcium; frog neuromuscular junction; IP₃.

3.2.2 Introduction

Production of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) is an internal communication pathway used by many cell types to release Ca²⁺ from internal stores and activate cascades of second messengers. To study the activation of the different IP₃ receptors and the second messenger pathways following IP₃ production, specific and efficient blockers are needed. However, few blockers of the IP₃ receptors have been characterised and proved to be specific when used on complex or intact preparations. For example, apart from inhibiting IP₃ receptors, heparin stimulates ryanodine receptors, the other main type of receptor involved in internal stores activation [1]. A permeable IP₃ receptor antagonist, 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) not only blocks IP₃ receptors, but also the intracellular Ca²⁺ pump and causes Ca²⁺ leakage from non-mitochondrial stores [2]. 2-APB also inhibits different subtypes of IP₃ receptors with different potencies [3] and it either increases or reduces the rate of inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current [4]. Caffeine also blocks IP₃ receptors, but it activates ryanodine receptors at the concentration needed to inhibit IP₃ receptors [5]. There are also antibodies against IP₃ receptors, however their use is complicated by the need to mechanically introduce them into cells. Therefore, the specific usage of IP₃ receptor blockers on complex systems or small cellular compartments preparations is made very difficult.

The recent discovery of xestospongins isolated from the Australian sponge *Xestospongia* sp seemed very promising as a new class of IP₃ receptor blockers [6]. Indeed, they are cell permeant compounds that appear to selectively block IP₃

receptor activation. A large number of studies have already been performed using XeC as an IP₃ receptor blocker in various number of cell types.

Recently, however, the specificity of xestospongins toward IP₃ receptors has been questioned. De Smet et al. (1999) have shown evidence that, apart from blocking the IP₃ receptor, xestospongin C (the most active compound of the xestospongin family) also potently blocked Ca²⁺ pump of the endoplasmic reticulum in permeabilized A7r5 smooth-muscle cells. It is interesting to note that, notwithstanding this report, quite a number of studies published in the past few years still used XeC as a specific IP₃ receptor blocker.

In the present study, we further investigated the specificity of XeC towards the IP₃ receptor and determined its blocking activity on SERCA (sarcoplasmic / endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase) pumps, using the frog neuromuscular junction (NMJ). It is an intact synaptic system in which both IP₃ and CICR Ca²⁺ stores are present. IP₃-dependent stores are present in perisynaptic Schwann (PSCs) cells, glial cells surrounding and covering the nerve terminal [8], where local applications of agonists and transmitter released during synaptic activity induces the release of Ca²⁺ from these internal stores [9-12]. In addition, ryanodine-dependent receptors are present in nerve terminals [13] and the muscle fibres [14]. It was shown that the blockade of SERCA with thapsigargin (tg) caused a large Ca²⁺ transient in PSCs that lead to the depletion of the internal stores while it caused a delayed Ca²⁺ clearance in nerve terminals that resulted in an increase in transmitter release. No effects of tg were observed in muscle fibres [8;13].

Here we show that XeC (700 nM) blocked Ca²⁺ responses elicited in PSCs by local applications of agonists or synaptic activity only when Ca²⁺ stores had

previously been challenged with local application of agonists. In addition, XeC produced a Ca^{2+} elevation that occluded the effects of tg. XeC application (700 nM) prolonged Ca^{2+} clearance from the terminal following synaptic activity. These effects of XeC were masked by tg and *vice versa*. As a whole, these results suggest that XeC acts as a blocker of the SERCA pump of internal stores.

3.2.3 Materials and methods

Preparations

Rana pipiens frogs were anaesthetised using 3-aminobenzoic acid ethyl ester (0.3 mg/g frog; prepared in frog Ringer solution) and then double pithed. The *cutaneus pectoris* muscle was dissected out, along with the *pectoralis proprius* nerve. Frog Ringer contained in mM: 120 NaCl, 5 MgCl_2 , 2 KCl, 1 NaHCO_3 and 15 HEPES, 1.8 CaCl_2 . The pH was adjusted to 7.20 with NaOH 5N.

XeC stock solutions (Calbiochem, Lot # B28625 and B39180; 525 μM) were prepared in DMSO and stored in 7 μl aliquots, kept at -20°C for a maximum of 2 months. These conditions were optimal for preserving XeC activity (Calbiochem product data sheet). Stock solutions of tg (Calbiochem; 2.5 mM) were prepared in DMSO and stored at -20°C for a maximum of 3 months. All stock solutions were protected from light. The experimental solutions were prepared in Ringer immediately prior to their use.

Immunohistochemistry

The presence of IP₃ receptors was determined using specific antibodies for type 1 and 2 IP₃ receptors. For IP₃ receptor 1 (IP₃R₁) labelling, we used a goat polyclonal IgG antibody (Santa Cruz; dilution 1:250) and a biotinylated anti-goat IgG (Santa Cruz, dilution 1:100) revealed by streptavidin-alexa Fluor 568 (dilution 1:100). IP₃ receptor 2 (IP₃R₂) were labelled using a goat polyclonal IgG antibody (Santa Cruz; dilution 1:250) and revealed by an anti-goat IgG, coupled with alexa Fluor 568 (Santa Cruz; dilution 1:100). Peanut lectin agglutinin coupled with FITC (PNA-FITC; dilution 1:100), that stains the extracellular matrix of the synaptic cleft was used to confirm the localisation of the neuromuscular junction (NMJ) [15]. A monoclonal antibody, 2A12 (mouse, IgM, 300 µl overnight at 4 °C, kindly provided by Dr. C.P. Ko, USC), that specifically stains PSCs at the frog NMJ [16], was also used to locate PSCs and determine the distribution and presence of their processes. The 2A12 antibody was revealed using an anti-mouse IgM coupled to FITC (dilution 1:500).

Images of IP₃R labelling and PNA-FITC or 2A12-FITC were simultaneously acquired using the dual channel configuration of the Bio-Rad MRC 600 confocal microscope. The excitation wavelength (514 nm) was attenuated to 1% using neutral density filters. Green fluorescence emitted by PNA-FITC or 2A12-FITC antibody was detected by one photomultiplier tube (PMT) through a band pass filter (505-535 nm) while the red fluorescence emitted by the IP₃R antibody coupled to Alexa Fluor 568 was detected by another PMT through a long-pass filter (cut-off at 590 nm).

Ca²⁺ Imaging of Perisynaptic Schwann Cells

For Ca²⁺ imaging of PSCs, *cutaneus pectoris* muscles were dissected from the frogs and incubated at room temperature (~21 °C) for 90 minutes in a fluo-3 AM (10 μM) solution prepared in Ringer solution containing 1% DMSO and 0.02% pluronic. After incubation, muscles were bathed in Ringer solution containing TPEN (tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine, 20 μM) with 0.01% EtOH. The time course of fluorescence changes in PSCs was monitored with a Bio-Rad MRC 600 confocal microscope using the 488 nm line of the argon ion laser (attenuated to 1%) for excitation of the indicator and the emitted light was detected through a long-pass filter at 515 nm. Images (192 by 128 pixels) were acquired every 645 ms before, during and after XeC (700 nM) application. These experiments were carried out in a closed bath configuration, where the Ringer solution was immediately replaced with Ringer containing 700 nM XeC after the baseline measurements of fluorescence (control). Ca²⁺ fluctuations are expressed as fluorescence changes: $\% \Delta F/F = [(F - F_{\text{rest}}) / F] * 100$.

For local applications of ATP, adenosine and muscarine (respectively 10, 10 and 2 μM in Ringer) a micropipette (tip ~ 2 μm) was brought at approximately 20 μm from PSCs previously loaded with the Ca²⁺ indicator fluo-3 AM. Pressure ejection of the neuromodulators was performed using a picospritzer (15 psi pulses of 650 ms) and the Ca²⁺ responses in PSCs were monitored using a confocal microscope as described above. Ca²⁺ changes within PSCs were measured at the level of the PSCs cell bodies, to minimize the possible interference from other cell compartments [9].

Ca²⁺ Imaging of Nerve Terminals

For specific imaging of Ca²⁺ changes in presynaptic nerve terminals, the *pectoralis proprius* nerves of *cutaneus pectoris* muscles were dissected through a small opening in the skin of the frog and laid on the thorax of the animal. The cut end of the nerves were washed with Mg²⁺ Ringer solution (containing 5 mM MgCl₂, no Ca²⁺ added) to minimize the closing of the extremity of the axons. Crystals of Ca²⁺-green -1 dextran (MW 3,000) were put on the cut end of the nerve and the preparation was left to incubate overnight (~14 hrs) at room temperature (~21 °C). Following the incubation period, muscles were dissected from the frogs, pinned down in a recording chamber and bathed in Ringer solution. Muscle contractions were prevented by blocking cholinergic receptors with α -bungarotoxin (1 μ M), which has no effect on PSCs cholinergic-evoked Ca²⁺ signals [9;17].

Nerve stimulation was delivered by a S88 Grass stimulator through a suction electrode. The line scan mode of the Bio Rad 600 confocal microscope was used to study Ca²⁺ responses elicited in nerve terminals by single pulse stimulation of the motor nerve evoked every 2 minutes. A linear portion of the nerve terminal was scanned at intervals of 2 ms and a total of 512 lines were acquired in every trial (total individual trial length: 1024 ms). Single pulse stimulation was triggered 200 ms after the beginning of the line scan trial acquisition. Ten (10) trials were averaged during control and 10 others were collected 10 min after XeC (700 nM) and/or tg (2 μ M) application. The amplitude and duration of the average Ca²⁺ responses evoked by single pulse stimulation were stable during the control period. Changes in fluorescence were monitored using a Bio-Rad MRC 600 confocal microscope

equipped with an argon ion laser producing an excitation wavelength at 488 nm. The intensity of the laser was attenuated to 1% using neutral density filters and the emitted light was detected through a long-pass filter at 515 nm.

Ca^{2+} changes were expressed as relative changes of fluorescence ($\%\Delta F/F$), as described above. The mean amplitude of the trials in every condition was expressed as the mean of the peak amplitude for every trial. The duration of the responses was measured as a function of the area under the curve (AUC), after normalisation of the peak to 100% $\Delta F/F$. AUC measurements were made at the beginning of the rising phase (last interception of zero before the peak) and ended when the recovery phase first reached baseline.

Statistical Analysis

All values are presented as mean \pm standard error of the mean. Student paired t-test was used when comparing data obtained from the same cell or NMJ while a one way Anova was performed when several treatments were compared. “N” indicates the number of preparations used, while “n” indicates the number of cells or NMJs.

3.2.4 Results

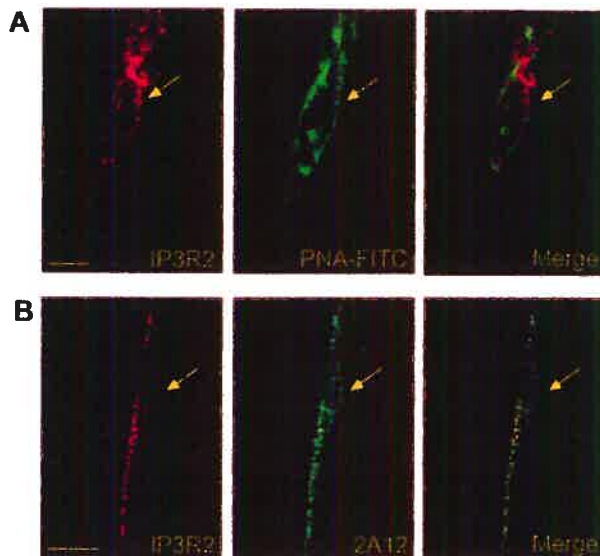
Labelling of IP₃ Receptors at the Frog Neuromuscular Junction

IP₃ receptors are believed to be present in PSCs since specific injection of IP₃ in these cells resulted in an elevation of Ca^{2+} and a modulation of transmitter release [8]. We

first confirmed the presence of IP_3 receptors in PSCs using immunohistochemistry techniques and then tested the effects of XeC on these cells.

Antibodies against the isoform 1 and 2 of the IP_3 receptor were used and revealed by secondary antibodies coupled to different fluorophores. Preparations were also labelled with PNA-FITC to identify NMJs or the antibody 2A12, that selectively stains PSCs and their processes at the frog NMJ [16]. The two labels were simultaneously observed using the dual channel mode of a Bio-Rad MRC 600 confocal microscope. Western blot analysis confirmed the specificity of both antibodies for these receptors towards amphibian nervous tissue (data not shown). As shown in Figure 1A, strong IP_3R_2 staining (red) was distributed within the PNA-FITC labelled NMJs (green), indicating that it was located at the synapse. The staining pattern revealed that PSCs were labelled since their cell body area was heavily stained in a typical punctated manner (Figure 1A). When the presence of IP_3R_2 staining was compared to the specific glial marker 2A12 monoclonal antibody, we observed a large portion of overlap between the two staining (merge, yellow, Figure 1B). However, staining for the IP_3R_1 was much weaker if any, and was not present at the NMJ (data not show). Hence, these results indicate that IP_3 receptors are present in PSCs where IP_3R_2 , but not IP_3R_1 , is the preponderant type.

Figure 1 *Distribution of IP₃R₂ at the frog neuromuscular junction*



A, False colour confocal images of immunohistochemical labelling of IP₃R₂ (red) at the frog neuromuscular synapse double labelled with PNA-FITC (green). The two images were simultaneously acquired using the dual channel of an MRC 600 confocal microscope and were superimposed (merge) to determine their relative distribution. Note that IP₃R₂ labelling is distributed within the boundaries of PNA-FITC labelling. **B**, The distribution of IP₃R₂ labelling in relation with the PSCs processes was determined using preparations double

labelled with IP₃R₂ antibody (red) and 2A12, a specific antibody for Schwann cells at the frog NMJ (green). The images were simultaneously acquired and merged to reveal that IP₃R₂ labelling was located in PSCs at the frog NMJ, as indicated by the abundance of yellow pixels (merge). Arrows point at PSCs somata. Scale bars in A, 10 μ m and B, 20 μ m.

Effects of Xestospongins C on Agonist- and Activity-Induced Ca²⁺ Responses in Perisynaptic Schwann Cells

Knowing that IP₃ receptors are present in PSCs of the frog NMJ, we then assessed the effects of XeC on these stores. PSCs possess G-protein-coupled receptors for various neurotransmitters whereby Ca²⁺ responses can be elicited in these cells via the production of IP₃. Ca²⁺ responses in PSCs can be induced reliably by local applications of ATP and adenosine up to four times before any run down of the responses occurs [9], whereas muscarinic- and nerve stimulation-induced Ca²⁺ responses show a significant rundown on the second and subsequent trials [9;17].

Nerve stimulation-induced Ca^{2+} responses are induced by the activation of muscarinic and ATP receptors [10;17].

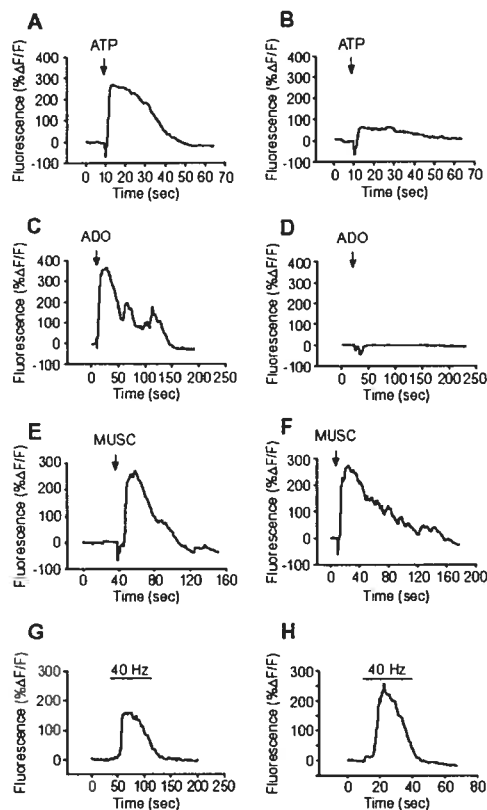
The effects of XeC on the IP_3 -controlled internal Ca^{2+} stores of PSCs were first tested using local applications of ATP and adenosine. A first control response was evoked by local pressure application using a borosilicate pipette. Immediately after the control response was terminated, the control solution was replaced by Ringer containing 700 nM XeC for 10 minutes before a second local application of the neuromodulator was performed on the same cell. The amplitude of the responses evoked by ATP after incubation in XeC (59 ± 13 % $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=7$, $N=4$) were significantly smaller than control responses (249 ± 37 % $\Delta\text{F}/\text{F}$, $n=7$, $N=4$; $P=0.002$) (Fig 2A,B). For adenosine, the amplitude of Ca^{2+} responses evoked after incubation in XeC (23 ± 9 % $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=6$, $N=3$) were also significantly smaller than the control responses (388 ± 65 % $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=6$, $N=3$; $P=0.003$) (Fig 2C,D). These results suggest that XeC blocked the activation of IP_3 receptors in PSCs consequently to the activation of purinergic receptors.

Owing to the rundown of PSCs Ca^{2+} responses observed for second and subsequent application of muscarine or nerve stimulation, the effects of XeC were not tested on the same cells. Surprisingly, XeC (700 nM) had no effect on Ca^{2+} responses elicited by muscarine (284 ± 25 % $\Delta\text{F}/\text{F}$ in ctrl and 280 ± 36 % $\Delta\text{F}/\text{F}$ in XeC; $n=10$; $N=10$; $P = 0.934$) (Fig 2E,F) or stimulation (137 ± 30 % $\Delta\text{F}/\text{F}$ in ctrl, $n=7$, $N=7$ and 265 ± 57 in XeC, $n=8$, $N=6$; $P = 0.081$) (Fig 2G,H). These results might suggest that muscarinic receptor activation induce the release of Ca^{2+} from different stores compared to ATP- and adenosine-induced responses.

These results are somewhat surprising since nerve stimulation-induced Ca^{2+} responses are in part due to the activation of ATP receptors [10] and, as such, should have been affected by XeC since ATP-induced responses were almost completely blocked. Because the experimental paradigm was different, we wanted to confirm that the effects of XeC observed for ATP and adenosine were reproducible in non-paired experiments. To do so, we applied ATP or adenosine on PSCs incubated for 10 min in XeC 700 nM, without any previous agonist applications. To our surprise we found that, without any previous evoked Ca^{2+} response, neither ATP nor adenosine Ca^{2+} responses were significantly different from their respective control responses (ATP in XeC: 353 ± 55 % $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=8, N=6$; $P=0.172$; adenosine in XeC: 325 ± 60 % $\Delta\text{F}/\text{F}$; $n=6, N=5$; $P=0.496$; see above for control values). One possible explanation for these results is that the concentration of XeC was not sufficient to completely block the IP_3 receptors. However, similar results were obtained when XeC was used at concentrations up to 2 μM (data not shown). Therefore, these results cannot be explained on the sole basis of XeC action on the IP_3 receptor since we have shown that the receptors are present (Fig 1) and functional [8] in the PSCs and that XeC blockade should have occurred regardless of the prior activation of the internal stores.

An alternative hypothesis would be that XeC blocks the SERCA pumps. This action would be consistent with the need for a prior release of Ca^{2+} from the stores which would empty them and the subsequent application of XeC would prevent them from refilling. In such conditions, no agonist-evoked Ca^{2+} response would be observed on a second attempt. The following series of experiments aim at testing this possibility.

Figure 2 Ca^{2+} responses elicited in PSCs by agonists and synaptic activity



changed in the presence of XeC. **G**, Control Ca^{2+} transient induced by synaptic activity (nerve stimulation at 40 Hz for 30 sec, solid bar) in a PSC. **H**, After incubation in XeC (700 nM for 10 min) a Ca^{2+} transient was elicited by repetitive nerve stimulation (40 Hz / 30 sec, solid bar) in an other PSC. Note that a large Ca^{2+} response was still evoked even in the presence of XeC (700 nM).

A, Control Ca^{2+} response elicited by local application of ATP (10 μM in the pipette; arrow) on a PSC. **B**, Ca^{2+} transient elicited by local ATP application (arrow) on the same PSC as in **A**, following 10 minutes of incubation in XeC (700 nM). Note that ATP-evoked Ca^{2+} response was largely reduced following XeC incubation. **C**, Control Ca^{2+} response evoked in a PSC by local application of adenosine (10 μM in the pipette; arrow). **D**, After incubation in XeC (700 nM for 10 min), a local application of adenosine (arrow) on the same PSC elicited a Ca^{2+} response that was greatly reduced or abolished. **E**, Control Ca^{2+} response elicited by local pressure application of muscarine (2 μM in the pipette; arrow). **F**, Ca^{2+} response elicited by local application of muscarine (2 μM in the pipette; arrow) in an other PSC, after a 10 min incubation in XeC 700 nM. Note that the amplitude of the Ca^{2+} transient was not

Xestospongins C causes Calcium Rises in Perisynaptic Schwann Cells

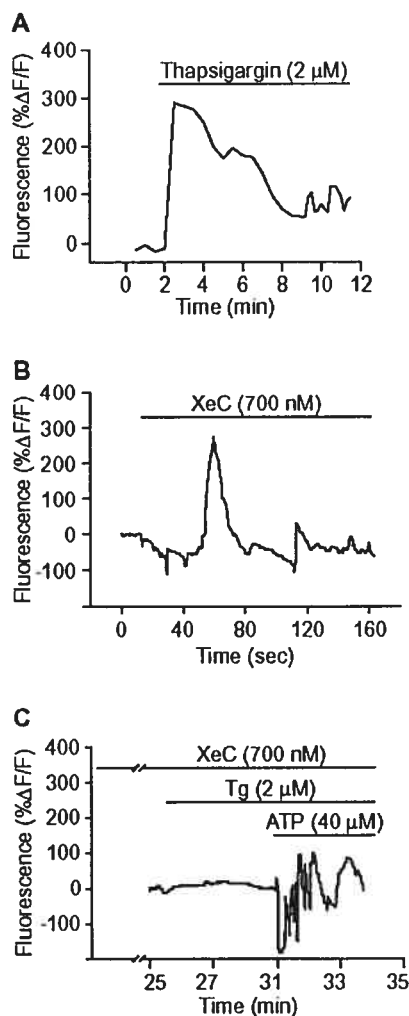
To test the possible effect of XeC on SERCA, we compared its action to tg, a well known SERCA blocker. The effects of XeC (700 nM) and tg (2 μM) on PSCs were investigated by monitoring intracellular levels of Ca^{2+} using the membrane permeant calcium indicator, fluo-3 AM. No Ca^{2+} changes were elicited by XeC or tg in the muscle fibres (data not shown; [8]).

As shown in Figure 3A and similarly to what we have previously shown [8], bath application of tg (2 μ M) elicited Ca^{2+} transients in PSCs (mean of 299 ± 65 $\% \Delta F/F$). Hence, if XeC acts as a SERCA inhibitor, its presence should cause also a Ca^{2+} transient due to a gradual emptying of the Ca^{2+} stores.

As shown in Figure 3B, bath application of XeC (700 nM) elicited an initial transient Ca^{2+} response (mean of 444 ± 219 $\% \Delta F/F$) in all PSCs tested ($N=5$, $n=9$), followed by a period of fluctuation around baseline for a period of about 18-20 min. The amplitude of the initial XeC-induced Ca^{2+} response was similar to the one evoked by the ATPase Ca^{2+} pump inhibitor tg (mean of 299 ± 65 $\% \Delta F/F$, Fig. 3A). However, the duration of the XeC-induced initial Ca^{2+} responses (0.9 ± 0.4 min) was shorter than the response evoked by Tg (12 ± 2 min). This suggests that, either XeC only partially blocks SERCA or that its interactions are governed by different binding interactions with the receptors than tg. Indeed, it is possible that XeC would perturb the Ca^{2+} handling mechanism sufficiently to produce an initial Ca^{2+} transient followed by a dynamic equilibrium that reduces the Ca^{2+} content of the stores gradually, over a longer period of time. To test this possibility, we recorded the Ca^{2+} changes induced by XeC in PSCs and let it return to a stable level of fluorescence, where no fluctuations of Ca^{2+} could be detected. Tg was then applied in the bath (40 μ M) hardly elicited any Ca^{2+} responses (Fig 3C). These data suggest that, in addition to a brief (average of 20 min after the initial XeC-induced Ca^{2+} transient) and the fluorescence of PSCs were monitored. In these conditions, application of tg (2 μ M) on top of XeC (700 nM) did not cause any significant Ca^{2+} elevation in PSCs (Fig 3C, same cell as in Fig 3B; 19 min after XeC-induced Ca^{2+} response). Subsequent

application of ATP initial rise in Ca^{2+} , XeC caused a gradual leak of Ca^{2+} from the internal stores of PSCs that eventually lead to their depletion.

Figure 3 *XeC interferes with SERCA Ca^{2+} pumps*



A, Ca^{2+} elevation in a PSC induced by bath application of the ATPase pump inhibitor tg (2 μM). B, Ca^{2+} elevation in a PSC induced by bath application of XeC (700 nM) on a PSC loaded with the Ca^{2+} indicator fluo-3 AM. Note the initial Ca^{2+} transient (different preparation than in A). C, Changes in Ca^{2+} fluorescence in a PSC induced by bath application of the ATPase pump inhibitor tg (2 μM) following 20 minute pre-incubation with XeC (700 nM). Note that no further Ca^{2+} elevation was observed when thapsigargin (2 μM) was added to the bath on the same cell as in B. Subsequent bath application of ATP (40 μM) induced only small baseline fluorescence fluctuations caused by the mechanical disturbance produced by the bath application of ATP.

Xestospongin C Mimics the Effects of Thapsigargin, a Blocker of the Ca^{2+} -ATPase Pump

It has been shown by Narita and collaborators (1998) that the presynaptic Ca^{2+} stores of this preparation are controlled by a ryanodine receptor. If XeC is a pure IP_3 receptor blocker, we should not see any effect on the kinetics of Ca^{2+} handling in nerve terminals following single pulse nerve stimulation. On the other hand, if XeC also acts as a blocker of the SERCA pump as suggested by the results presented above and knowing that the pump inhibitor tg prolongs the Ca^{2+} clearance in presynaptic terminals, we should see a similar lengthening of Ca^{2+} clearance following single pulse stimulation (i.e. 10 individual Ca^{2+} responses evoked by nerve stimulation) [8].

We used Calcium green -1 dextran, selectively loaded in the nerve terminals to image the Ca^{2+} entry following single pulse stimulation. A first set of 10 line scans were acquired in control, and XeC (700 nM) was then added to the bath for 10 minutes before the next set of 10 line scans was acquired. Finally, after removing the previous solution, a new solution containing both 2 μM of tg and 700 nM of XeC was added to the bath and allowed to incubate 10 minutes before the last set of 10 line scans was acquired.

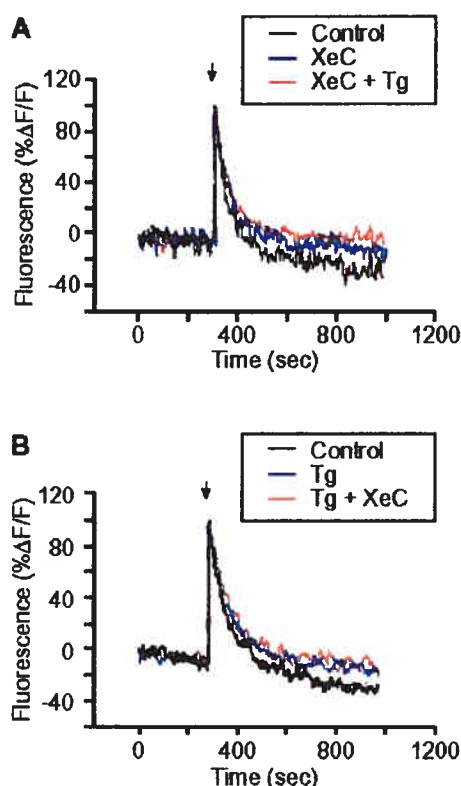
Following bath application of XeC (700 nM), although slightly larger, the amplitude of the Ca^{2+} elevation in the nerve terminals was not significantly increased compared to control (28 ± 5 $\% \Delta F/F$ in control and 37 ± 4 $\% \Delta F/F$ in XeC, $N=6$; $P=0.181$; Fig. 4A, blue trace). However, the duration of the Ca^{2+} transients measured using the area under the curve of the 10 averaged line scans with the peak amplitude

of the responses normalized to 100% was significantly augmented ($2370 \pm 220 \Delta F^*s$ in control to $2886 \pm 234 \Delta F^*s$ in XeC; $N=6$ $P<0.001$; Fig 4A, blue trace). These results are similar to those reported for tg on the Ca^{2+} stores of nerve terminals [8]. Tg was then added to test whether XeC could mask its effects. Tg ($2 \mu M$) had no further effect when applied after XeC since neither the amplitude ($35 \pm 10 \% \Delta F/F$ in XeC to $38 \pm 12 \% \Delta F/F$ in XeC + tg; $N=6$; $P=0.209$; Fig. 4A, red trace) nor the duration of the responses ($2886 \pm 234 \Delta F^*s$ in XeC, to $2982 \pm 316 \Delta F^*s$ in XeC + tg; $N=6$; $P=0.671$; Fig 4A, red trace) were affected. These results suggest that similarly to tg, XeC modulates presynaptic Ca^{2+} handling mechanisms by affecting the SERCA pump. If it is so, the presence of the pump inhibitor tg should also mask the effects of XeC.

To test this possibility, tg ($2 \mu M$) alone was first added to the bath after the control period and then both tg ($2 \mu M$) and XeC (700 nM) were subsequently added. Similarly to the XeC condition and as previously reported [8], when tg ($2 \mu M$) alone was added to the bath after the control period, the amplitude of the Ca^{2+} transient was not significantly changed compared to the amplitude of the control responses ($30 \pm 7 \Delta F^*s$ in control to $35 \pm 10 \Delta F^*s$ in tg; $N=5$; $P=0.107$; Fig 4B, blue trace) but the duration of the Ca^{2+} transient was significantly augmented ($2239 \pm 102 \Delta F^*s$ in control to $2762 \pm 234 \Delta F^*s$ in tg; $N=5$; $P=0.029$; Fig 4B). When XeC (700 nM) was subsequently added to tg ($2 \mu M$), neither the duration ($2762 \pm 234 \Delta F^*s$ in tg to $2960 \pm 251 \Delta F^*s$ in tg + XeC; $N=5$; $P = 0.719$; Fig 4B, red trace), nor the amplitude of the Ca^{2+} responses were significantly augmented ($35 \pm 10 \Delta F^*s$ in tg to $39 \pm 12 \Delta F^*s$ in tg + XeC; $N=5$; $P= 0.746$; Fig 4B, red trace).

These results indicate that tg and XeC act on similar presynaptic Ca^{2+} handling mechanisms.

Figure 4 Ca^{2+} transients recorded in nerve terminals following single pulse stimulation in the presence of XeC, tg or both



A, Ca^{2+} responses (peak normalized to 100%) elicited by a single action potential and recorded in a nerve terminal loaded with the Ca^{2+} indicator Calcium green -1 dextran (black trace, average of 10 trials). In the presence of XeC (700 nM, after 10 minutes of incubation), the decay time of the Ca^{2+} response was lengthened (blue trace, average of 10 trials). Subsequent application of tg (2 μM) had no additional effects in the decay time of the Ca^{2+} response (red trace, average of 10 trials). **B**, Ca^{2+} transients following single pulse stimulation recorded in another nerve terminal in control (black trace, average of 10 trials) and after tg was added to the bath 10 minutes prior to the recordings (blue trace, average of 10). Note that in the presence of tg, the decay time of the response was lengthened. Subsequent addition of XeC (700 nM) in the bath had no additional effects in the kinetics of the Ca^{2+}

transients recorded in nerve terminals (red trace, average of 10 trials). These results indicate that XeC masks the effects of tg and *vice versa*.

3.2.5 Discussion and conclusions

In this study, we investigated whether Xestospongine C (XeC) could act as a blocker of the SERCA pump. The amphibian NMJ was used because it is an intact synaptic structure composed of 3 cellular elements that are differentially regulated by IP_3 - and ryanodine-driven internal stores of Ca^{2+} , allowing us to evaluate the effects of XeC on these two types of internal stores. Two main lines of evidence strongly suggest that XeC does not act solely as an IP_3 receptor blocker, but that it also acts as a potent inhibitor of the ATPase pump of internal stores.

The first line of evidence is based on the results obtained with PSCs. The immunolabelling experiments presented here, as well as our previous results obtained using specific injection of IP_3 in these cells, strongly suggest that they possess functional IP_3 receptors, mainly of type 2. Moreover, the release of Ca^{2+} from internal stores is the main mechanism regulating Ca^{2+} elevation in these cells, and it is controlled by all neurotransmitters regulating the activity of the PSCs at least in part by IP_3 receptors [8-10;17]. Hence, based on these observations, one should have predicted that XeC should have blocked or at least reduced the release of Ca^{2+} by the agonists and synaptic activity. However, we were unable to prevent the induction of Ca^{2+} responses in the presence of XeC for 10 minutes, unless prior applications of agonist were performed and that XeC was applied on the preparation when its internal Ca^{2+} stores had already been challenged. Furthermore, as it was also observed using the SERCA pump inhibitor tg, XeC was capable of inducing a transient release of Ca^{2+} from internal stores of PSCs. However, although it was of comparable amplitude, Ca^{2+} transient induced by the application of XeC on PSCs' fully loaded

Ca^{2+} stores resumed significantly faster and was followed by a prolonged period (~20 min) where Ca^{2+} fluctuations could be seen. After termination of these fluctuations, the effects of tg were completely masked by the presence of XeC suggesting that XeC and tg target the same functional site, the SERCA pump. Importantly, the concentration of XeC used in these experiments was very low (~2 times its EC50; [6]). Hence, the results cannot be explained on the basis of a non-selectivity of the drug at these concentrations. In fact, in most studies, XeC was used at concentrations ranging from 1 μM up to 100 μM , that are 1.5 to 140 times higher than the concentrations used in the present study.

Interestingly, De Smet et al. (1999) observed that XeC did not affect the passive $^{45}\text{Ca}^{2+}$ leak from the non-mitochondrial internal Ca^{2+} stores. This discrepancy with our observations on PSCs might be explained by the difference in the cell types and also by the time resolution of the measurements performed by the two techniques ($^{45}\text{Ca}^{2+}$ measurements in permeabilized cells vs Ca^{2+} imaging *in situ*).

The second line of evidence that XeC might act as a SERCA blocker was obtained from experiments performed on the dynamics of Ca^{2+} entry in the presynaptic terminals evoked by single action potentials. The presynaptic terminals were used as a cellular compartment that does not show a significant contribution of IP_3 receptors, but instead where the CICR type of stores is mainly predominant [13]. Hence, one would have predicted that XeC should have had no or little effects on the Ca^{2+} dynamics of the presynaptic terminals. However, in the presence of XeC the duration of the Ca^{2+} transient induced by single action potentials was significantly increased. Interestingly, not only this effect is identical to the effect of tg [8], but the

presence of XeC masked completely the effects of tg and vice versa. These results strongly suggest that, at the amphibian nmj, XeC acted as a potent inhibitor of the ATPase pump. The lengthening of the Ca^{2+} transient is likely due to the reduction of the Ca^{2+} clearance by the ATPase pump, leading to a prolonged accumulation of Ca^{2+} . This effect has been shown to increase the release of neurotransmitters [8;13]. Consistent with this observation, preliminary experiments revealed that XeC also increased transmitter release (data not shown). Finally, similarly to tg, XeC did not rise the resting level of Ca^{2+} , possibly because the presynaptic Ca^{2+} stores are empty at rest [8].

Hence, the similarity of the effects of XeC and tg produced in PSCs (IP_3 receptors [8;18-21]) and in the presynaptic terminals (ryanodine receptors controlled by CICR mechanisms [22-26]) strongly argues that XeC acts by blocking the SERCA pump and that the effects of XeC observed in nerve terminals is unlikely due only to interactions with IP_3 receptors.

Taken together, these results suggest that besides its reported IP_3 receptor blocking actions [6;27], XeC appears to be a very efficient blocker of the ATPase pump of the internal stores at low concentration. More importantly, the low concentration at which XeC appears to act on SERCA pumps seriously limits the use of the toxin at concentrations that would separate the effects on the SERCA pump from the effects on IP_3 receptors.

3.2.6 References

1. Bezprozvanny IB, Ondrias K, Kaftan E, Stoyanovsky DA, Ehrlich BE. Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent. *Mol Biol Cell* 1993; **4**: 347-352.
2. Missiaen L, Callewaert G, De Smedt H, Parys JB. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca^{2+} pump and the non-specific Ca^{2+} leak from the non-mitochondrial Ca^{2+} stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 2001; **29**: 111-116. doi: 10.1054/ceca.2000.0163
3. Kukkonen JP, Lund PE, Akerman KE. 2-aminoethoxydiphenyl borate reveals heterogeneity in receptor- activated Ca^{2+} discharge and store-operated Ca^{2+} influx. *Cell Calcium* 2001; **30**: 117-129. doi: 10.1054/ceca.2001.0219
4. Prakriya M, Lewis RS. Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* 2001; **536**: 3-19.
5. Bezprozvanny I, Bezprozvannaya S, Ehrlich BE. Caffeine-induced inhibition of inositol(1,4,5)-trisphosphate- gated calcium channels from cerebellum. *Mol Biol Cell* 1994; **5**: 97-103.
6. Gafni J, Munsch JA, Lam TH et al. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor. *Neuron* 1997; **19**: 723-733.
7. De Smet P, Parys JB, Callewaert G et al. Xestospongin C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pumps. *Cell Calcium* 1999; **26**: 9-13. doi: 10.1054/ceca.1999.0047
8. Castonguay A, Robitaille R. Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca^{2+} Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 2001; **21**: 1911-1922.
9. Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 1992; **8**: 1069-1077.

10. Robitaille R. Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 1995; **15**: 7121-7131.
11. Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP. Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 1999; **19**: 3836-3846.
12. Rochon D, Rousse I, Robitaille R. Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 2001; **21**: 3819-3829.
13. Narita K, Akita T, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K. A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism involved in asynchronous exocytosis at frog motor nerve terminals. *J Gen Physiol* 1998; **112**: 593-609.
14. Bull R, Marengo JJ, Suarez-Isla BA, Donoso P, Sutko JL, Hidalgo C. Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentrations of ryanodine. *Biophys J* 1989; **56**: 749-756.
15. Ko CP. A lectin, peanut agglutinin, as a probe for the extracellular matrix in living neuromuscular junctions. *J Neurocytol* 1987; **16**: 567-576.
16. Astrow SH, Qiang H, Ko C-P. Perisynaptic Schwann cells at neuromuscular junctions revealed by a novel monoclonal antibody. *J Neurocytol* 1998; **27**: 667-681.
17. Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP. Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 1997; **504**: 337-347.
18. Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 6822-6829.
19. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999; **22**: 208-215.
20. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998; **391**: 281-285.

21. Castonguay A, Lévesque S, Robitaille R. Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog Brain Res* 132, 237-250. 2001. Ref Type: In Press
22. Peng Y. Ryanodine-sensitive component of calcium transients evoked by nerve firing at presynaptic nerve terminals. *J Neurosci* 1996; **16**: 6703-6712.
23. Smith AB, Cunnane TC. Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic nerve terminals of the guinea-pig. *J Physiol* 1996; **497** (Pt 3): 657-664.
24. Lin YQ, Brain KL, Bennett MR. Calcium in sympathetic boutons of rat superior cervical ganglion during facilitation, augmentation and potentiation. *J Auton Nerv Syst* 1998; **73**: 26-37.
25. Schwartz AD, Whitacre CL, Wilson DF. Do ryanodine receptors regulate transmitter release at the neuromuscular junction of rat? *Neurosci Lett* 1999; **274**: 163-166.
26. Krizaj D, Bao JX, Schmitz Y, Witkovsky P, Copenhagen DR. Caffeine-sensitive calcium stores regulate synaptic transmission from retinal rod photoreceptors. *J Neurosci* 1999; **19**: 7249-7261.
27. Kanki H, Kinoshita M, Akaike A, Satoh M, Mori Y, Kaneko S. Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for the opening of mouse trp5 channels. *Mol Pharmacol* 2001; **60**: 989-998.

3.3 Discussion et conclusion du chapitre troisième

Pris dans leur ensemble, les résultats présentés dans cet article montrent que, à basse concentration (700 nM), la XeC peut agir en tant que bloqueur des pompes Ca^{2+} -ATPases des réserves intracellulaires. Il s'ensuit qu'à des concentrations aussi faibles que 700 nM pour bloquer les SERCA, il est difficile de séparer les effets sur les pompes des réserves calciques des effets du blocage des récepteurs à l' IP_3 , qui nécessite des concentrations de l'ordre du micromolaire (μM) pour produire son action au niveau de préparations non-perméabilisées.

En 1997, Gafni et ses collaborateurs ont publié une étude dont les résultats montraient que plusieurs molécules de la famille des xestospongines, des substances isolées de l'éponge de mer *Xestospongia* sp, pouvaient agir comme bloqueurs des récepteurs à l' IP_3 . Cette équipe a réalisé ses études au niveau de vésicules du réticulum endoplasmique du cervelet de lapin et de cellules entières : PC12 et astrocytes primaires en culture.

Or, depuis la parution de cet article, d'autres études ont questionné la spécificité d'action de la XeC au niveau des récepteurs à l' IP_3 .

Outre l'article de De Smet et ses collaborateurs (1999), qui montrait que la XeC pouvait agir comme inhibiteur des pompes Ca^{2+} -ATPases au niveau des cellules musculaires lisses A7R5 perméabilisées, un article très intéressant paru en décembre 2002, montre que la XeC ne semble pas avoir les mêmes effets au niveau des préparations perméabilisées et des préparations ayant conservé leur intégrité membranaire (Ozaki et al., 2002). Les travaux de cette équipe montrent qu'au niveau

des préparations cellulaires perméabilisées, la XeC agit comme un bloqueur spécifique des récepteurs à l'IP₃, alors qu'au niveau de préparations non-perméabilisées, la XeC ne conserve pas sa spécificité d'action envers les récepteurs à l'IP₃, mais interfère aussi avec le fonctionnement d'autres canaux ioniques (Ca²⁺ et K⁺ voltages-dépendants).

En accord avec les résultats que nous avons publiés, d'autres évidences de la non spécificité d'action de la XeC envers les récepteurs à l'IP₃ ont été rapportées dans différentes conditions. La prudence est donc de mise dans l'utilisation de cette famille de composés si l'effet recherché est une action spécifique au niveau des récepteurs à l'IP₃ dans une préparation complexe. Il importe de contrôler de façon rigoureuse la spécificité de leurs effets dans les conditions pour lesquelles elles sont employées.

Ces résultats montrent bien la complexité des interactions possibles de la XeC à travers les différentes préparations. Il nous sera donc impossible d'utiliser cette substance pour la suite de nos travaux, en raison de ses effets non-spécifiques au niveau de la JNM de grenouille.

3.4 *Références du chapitre troisième*

- Aureliano M, Mdeira VM (1994) Interactions of vanadate oligomers with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1221: 259-271.
- Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ Peppiatt CM (2002) 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release. *The FASEB Journal* 16: 1145.
- Brunder DG, Gyorke S, Dettbarn C, Palade P (1992) Involvement of sarcoplasmic reticulum ' Ca^{2+} release channels' in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle. *J Physiol* 445: 759-778.
- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca^{2+} Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21: 1911-1922.
- Castonguay A, Robitaille R (2002) Xestospongins C is a potent inhibitor of SERCA at a vertebrate synapse. *Cell Calcium* 32: 39-47.
- Dasso LL, Taylor CW (1991) Heparin and other polyanions uncouple alpha 1-adrenoceptors from G-proteins. *Biochem J* 280 (Pt 3): 791-795.
- De Smet P, Parys JB, Callewaert G, Weidema AF, Hill E, De Smedt H, Erneux C, Sorrentino V, Missiaen L (1999) Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pumps. *Cell Calcium* 26: 9-13.
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN (1997) Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19: 723-733.
- Missiaen L, Callewaert G, De Smedt H, Parys JB (2001) 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca^{2+} pump and the non-specific Ca^{2+} leak from the non-mitochondrial Ca^{2+} stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 29: 111-116.
- Narita K, Akita t, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K (1998) A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} Release Mechanism Involved in Asynchronous Exocytosis at Frog Motor Nerve Terminals. *The Journal of General Physiology* 112: 593-609.
- Ozaki H, Hori M, Kim YS, Kwon SC, Ahn DS, Nakazawa H, Kobayashi M, Karaki H (2002) Inhibitory mechanism of xestospongins-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 137: 1207.

4 Chapitre quatrième

***Modulation de la transmission synaptique
par différents schèmes d'élévations calciques gliales
induites par la photolyse de Ca^{2+} encagé
à la JNM d'amphibien***

4.1 Introduction

Dans cette dernière série d'expériences, nous désirons raffiner notre étude des conséquences des élévations calciques gliales au niveau de la transmission synaptique en utilisant des élévations purement calciques, d'amplitude contrôlée et exclusivement localisées au niveau des CSPs.

Les expériences effectuées à l'aide de la TG décrites au chapitre deuxième avaient le désavantage de vider complètement les réserves calciques gliales et de prévenir leur remplissage, causant des élévations calciques beaucoup plus importantes que celles qui sont initiées physiologiquement par la TS ou l'application locale de NTs. De plus, la TG interférait aussi avec le fonctionnement des réserves calciques présynaptiques, ce qui prolongeait le temps de clairance du Ca^{2+} entré lors de l'activité synaptique. Ce faisant, une partie de l'effet total observé au niveau de la TS provenait de l'effet de la TG au niveau de l'élément présynaptique. Il nous fallait donc trouver une méthode pour induire des changements calciques purement gliaux et d'amplitude comparable à ceux qui sont évoqués physiologiquement.

Cependant, nous ne pouvions procéder par une activation des récepteurs de surface des CSPs, via l'application locale d'agonistes ou induction de la TS. En effet, nous savons déjà que les récepteurs gliaux pour les neurotransmetteurs et neuromodulateurs endogènes à la JNM (ACh, ATP, adénosine, substance P) possèdent tous un système d'effecteurs intracellulaires couplé aux protéines G. L'activation de ces récepteurs, par l'application locale de leur agoniste respectif ou

encore par l'activité synaptique, provoquerait la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires des CSPs, mais activerait aussi d'autres cascades de messagers seconds au passage, rendant la discrimination des effets exclusivement attribuables aux élévations calciques gliales impossible.

Nous devons donc procéder par une méthode qui court-circuiterait l'activation de tout système de messagers seconds en amont des élévations calciques gliales. De plus, nous devons éliminer la possibilité que des autorécepteurs présynaptiques soient stimulés par l'application de NTs sur la préparation.

Nous avons donc poursuivi notre étude en utilisant la photolyse de Ca^{2+} engagé pour produire les élévations calciques des CSPs. Cette méthode possède l'avantage de court-circuiter l'activation du métabolisme glial et de produire des élévations purement calciques, exclusivement au niveau du corps cellulaire des CSPs.

De plus, en variant les paramètres de photolyse, nous avons pu produire des élévations calciques gliales d'amplitude et de durée comparables à celles qui sont évoquées par l'application locale de NT ou par l'activité synaptique. De cette façon, nous avons pu déterminer si des changements calciques gliaux d'ordre physiologique pouvaient induire des changements de la transmission synaptique, et comparer ces changements à ceux qui sont observés suite à la vidange totale des réserves intracellulaires par la TG.

L'étape suivante de notre démarche visait à produire des élévations calciques gliales photo-induites de faible amplitude, afin de voir si celles-ci 1) produisaient aussi des changements au niveau de la TS et 2) si l'amplitude de ces changements était reliée à la quantité de Ca^{2+} libéré au niveau des CSPs.

Nos résultats ont montré que malgré les différences importantes dans l'amplitude et la durée des changements calciques gliaux induits par la photolyse et la TG, nous obtenons toujours une potentialisation similaire de la TS.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Imagerie

La préparation du muscle *cutaneus pectoris* de grenouille est utilisée pour nos expériences. Les animaux sont d'abord anesthésiés par immersion dans une solution d'acide 3-aminobenzoïque (0.3 mg/g de grenouille, préparé dans du Ringer normal), puis sont décérébrés et démédullés. Le muscle *cutaneus pectoris* ainsi que son nerf moteur, le *pectoralis proprius* sont alors disséqués et placés dans une chambre d'enregistrement.

Le Ringer normal de grenouille contient (en mM) : 120 NaCl, 2 KCl, 1 NaHCO₃, 15 HEPES et 1.8 CaCl₂. Son pH est ajusté à 7.20 à l'aide de NaOH 5N.

Les changements calciques des CSPs et des terminaisons nerveuses ont été visualisés à l'aide d'indicateurs calciques (fluo-3, AM et Ca²⁺-Green -1 dextran) excités par le laser argon (488 nm) d'un microscope Zeiss LSM 510, équipé d'un filtre long-pass à 505 nm.

4.2.1.1 *Chargement antérograde spécifique d'un indicateur calcique au niveau des terminaisons nerveuses*

Le Calcium Green -1 dextran (MW 3000) est un indicateur calcique non perméable aux membranes que nous avons spécifiquement introduit au niveau des terminaisons nerveuses pour l'observation de leurs changements calciques. Le nerf moteur *pectoralis proprius* innervant le muscle *cutaneus pectoris* est d'abord disséqué par une incision d'environ 1 cm pratiquée sur le côté du thorax de l'animal. Afin de ralentir la fermeture du bout coupé des axones moteurs, le bout du nerf ainsi disséqué est abondamment rincé à l'aide de Ringer sans Ca^{2+} (Ringer Mg^{2+}) contenant en mM : 5 MgCl_2 , 2 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 NaHCO_3 et 15 HEPES; pH ajusté à 7.2 à l'aide de NaOH 5N.

Le calcium green est introduit dans les axones en appliquant des cristaux de l'indicateur directement sur le bout coupé du nerf moteur, déposé sur la peau du ventre de l'animal, alors que le muscle est laissé intact dans la grenouille. L'indicateur calcique est alors transporté de façon antérograde jusqu'aux terminaisons nerveuses. Après 14 heures d'incubation, le *cutaneus pectoris* est disséqué et placé dans une chambre d'enregistrement pour l'observation des changements calciques des terminaisons.

4.2.1.2 Photolyse et chargement glial

Afin de visualiser et produire les élévations calciques dans les CSPs, un indicateur calcique, le Fluo-3, AM, et un chélateur de calcium encagé, le 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophényl)-1,2-diaminoéthane-*N,N,N',N'*-acide tétraacétique, tetra(ester d'acétoxyméthyle) (DMNP-EDTA, AM) sont introduits dans les cellules en 2 étapes. Dans un premier temps, le muscle *cutaneus pectoris* de grenouille est exposé à une solution de Ringer contenant 10 μ M de Fluo-3, AM, 0.1 % de pluronic et 1% de sulfoxyde de diméthyle (DMSO). Après 30 minutes, cette solution est remplacée par une solution de Ringer contenant 10 μ M de Fluo-3, AM, 20 μ M de DMNP-EDTA, AM, et 0.2 % de pluronic avec une concentration finale de 3% de DMSO. Cette dernière solution est laissée sur la préparation 90 minutes avant d'être rincée avec du Ringer normal pendant 20 minutes (env. 1 ml/min).

La photolyse multiphoton du DMNP-EDTA AM est effectuée par un faisceau lumineux pulsé à la femtoseconde par un laser titanium-saphire (mira 900 ; Source : Verdi, 5.5 W) à 730 nm (laser multiphoton).

4.2.1.2.1 Utilisation du laser multiphoton pour la photolyse de Ca^{2+} encagé

Deux principales techniques de photolyse pouvaient être utilisées pour la suite des expériences : La photolyse utilisant un seul photon ultraviolet de grande énergie (simple photon ; SP), ou encore la photolyse employant deux photons infrarouges de plus faible énergie (multiphoton ; MP). Brièvement, pour la photolyse utilisant un seul photon UV de grande énergie, la photolyse s'effectuera dans une grande partie du cône d'illumination, comparativement à la photolyse MP qui ne

pourra s'effectuer que dans un volume restreint, tout près du point focal (voir figure 1). En théorie, la diminution du taux d'excitation en simple photon lorsque l'on s'éloigne d'une distance z du point focal est proportionnelle à z^{-2} , alors qu'elle est de z^{-2N} en multiphoton (N représentant le nombre de photon devant être absorbés simultanément : deux photons dans notre cas). En pratique, la diminution du taux d'excitation MP se fait tellement rapidement lorsque l'on s'éloigne du point focal qu'elle est circonscrite à l'intérieur d'un micron.

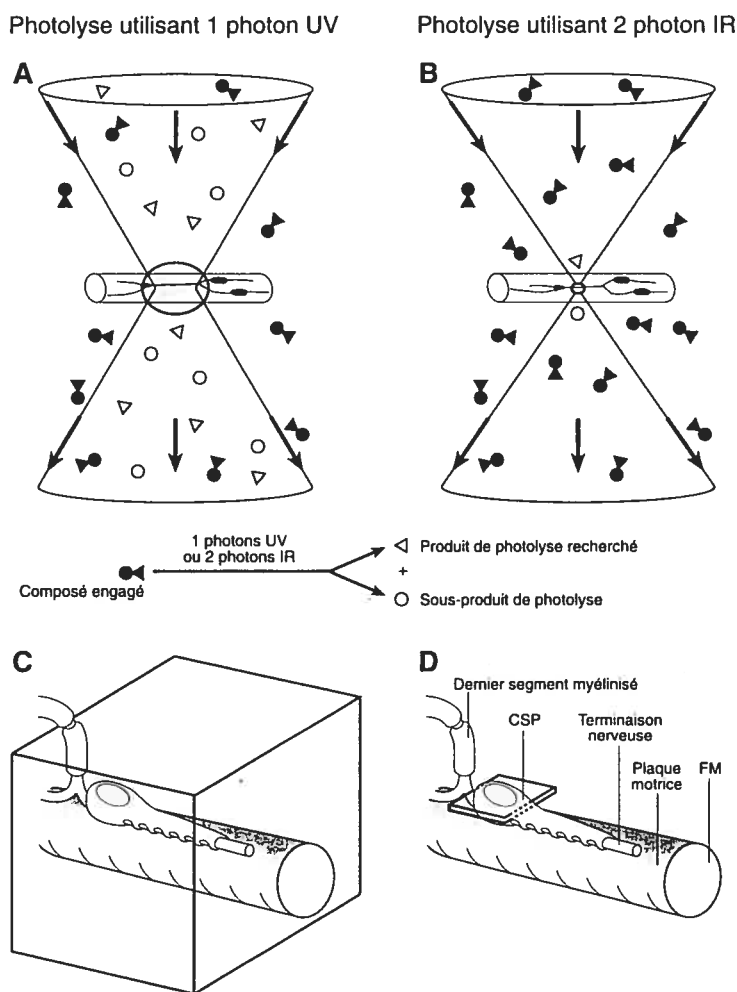
Afin de vérifier les effets d'élévations calciques gliales de différentes amplitudes au niveau de la transmission synaptique, nous avons donc choisi d'utiliser la photolyse de Ca^{2+} encagé à l'aide d'un laser multiphoton. Cette méthode a pour principal avantage de nous permettre d'induire des changements purement calciques et confinés aux CSPs, grâce à sa résolution spatiale.

En effet, cette caractéristique du point d'excitation confocal multiphoton nous permet de confiner la photolyse de Ca^{2+} encagé aux CSPs, sans qu'elle n'ait lieu dans les terminaisons nerveuses sous-jacentes (voir plus loin). Ceci est d'une grande importance, puisque nous mesurons la libération de NT, et que celle-ci est étroitement liée à la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des terminaisons nerveuses. De plus, nous utilisons un chélateur de Ca^{2+} photo-labile perméable aux membranes et donc retrouvé dans tous les compartiments cellulaires de notre préparation, ce qui signifie que l'on pourrait en principe provoquer des élévations calciques présynaptiques, postsynaptiques et gliales.

Or, la photolyse MP ne s'effectue qu'au plan focal du laser ($< 1 \mu\text{m}$), là où l'énergie suffisante est atteinte. Lors de la photolyse multiphoton, le laser est déplacé

en X et Y sur la préparation fin de couvrir la totalité de la région d'intérêt spécifiée, couvrant le corps cellulaire de la CSP. Cette région d'intérêt peut être balayée plus d'une fois (nombre d'itérations) et avec plus ou moins d'atténuation de la puissance de sortie du laser multiphoton. En variant ces paramètres de stimulation, il nous est possible de contrôler l'amplitude des élévations calciques que nous désirons induire dans les CSPs.

Figure 1. Comparaison des caractéristiques de la photolyse par simple photon et multiphoton



Dans cette étude, les réponses calciques ont été évoquées dans les CSPs des JNMs enregistrées, en procédant à 10, 20 ou 30 itérations avec 20 ou 30% de la puissance de sortie totale du laser titanium-saphire (région totale de photolyse de 444 μm^2). Les CSPs d'une même JNM étaient activées en même temps, chacune d'entre elle recevant la première itération avant que la deuxième itération ne soit amorcée et ainsi de suite, jusqu'à ce que le nombre voulu d'itérations soit atteint.

La photolyse multiphoton possède de plus l'avantage de limiter au maximum la dispersion du sous-produit de la photolyse du DMNP-EDTA (le 2-nitrosobenzoyl; voir figure1). Ce résidu de la photolyse est susceptible de réagir avec les résidus amine intracellulaires et d'induire de la cytotoxicité s'il est retrouvé en grande concentration sans être réduit (par l'addition de dithiothreitol dans la solution de perfusion (McCray et Trentham, 1989)). Cependant, puisque la photolyse MP ne s'effectue qu'au plan focal du laser, là où l'énergie suffisante pour qu'elle s'opère est atteinte, nous limitons au maximum la dispersion des sous-produits de la photolyse, diminuant les risques que ceux-ci puissent intervenir dans le fonctionnement normal des CSPs de la JNM étudiée.

4.2.2 Enregistrements électrophysiologiques

L'enregistrement des potentiels de plaque motrice (PPMs) a été effectué à l'aide d'électrodes intracellulaires (10-15 $\text{M}\Omega$, remplies avec du KCl 2M) insérées dans les fibres musculaires postsynaptiques et sauvegardés à l'aide du logiciel pClamp (Axon Instruments). Les PPMs ont été évoqués en stimulant le nerf moteur

de la préparation à 0.2 Hz et les contractions musculaires ont été abolies par l'utilisation de chlorure de d-tubocurarine (3.7 - 4.3 $\mu\text{g/ml}$ de Ringer normal).

4.2.3 Analyses

4.2.3.1 *Imagerie*

Les réponses calciques des CSPs sont présentées sous forme de $\% \Delta F/F$, où la fluorescence brute est transformée selon l'équation suivante pour rendre compte en pourcentage des changements relatifs au niveau de fluorescence du contrôle : $[(F - F_{\text{contrôle}})/F] \times 100$. $F_{\text{contrôle}}$ est la moyenne du niveau de fluorescence pour toute la période contrôle. Les valeurs rapportées pour chaque expérience constituent la moyenne des maximums des $\% \Delta F/F$ pour chaque CSP \pm l'erreur standard. Pour ces expériences N est le nombre de JNM et n, le nombre de CSPs. La durée des réponses calciques photo-induites est considérée comme étant comprise entre le moment du début de la photolyse et le moment auquel la réponse (exprimée en $\% \Delta F/F$) intercepte de nouveau la valeur de zéro.

4.2.3.2 *Électrophysiologie*

Pour chaque expérience, l'amplitude des PPMs des niveaux contrôle et potentialisé sont déterminés en prenant l'amplitude moyenne des 20 derniers PPMs de la période contrôle (A_{ctrl}), alors que l'amplitude des PPMs potentialisés est déterminée en moyennant l'amplitude de 20 PPMs, pris de part et d'autre de la valeur la plus élevée rencontrée (A_{pic}). L'augmentation de la taille des PPMs est exprimée en pourcentage

d'augmentation par rapport à la valeur de l'amplitude des réponses recueillies en contrôle par : $[(A_{pic}-A_{ctrl})/A_{ctrl}] \times 100$. N représente le nombre de JNMs enregistrées.

4.3 Résultats

4.3.1 La photolyse de Ca^{2+} encagé avec le laser multiphoton peut être utilisée pour produire des élévations calciques au niveau des CSPs

Nous avons choisi de séparer les élévations calciques par photolyse de Ca^{2+} encagé en 2 catégories : les « petites » élévations ($< 100 \% \Delta F/F$) similaires à celles observées dans des conditions de faible libération de NT et les « grandes » élévations ($> 200 \% \Delta F/F$) similaires à celles observées dans des conditions de forte libération de NT. En changeant le nombre d'itérations et le réglage de la puissance de sortie du laser multiphoton, il nous a été possible de produire des élévations calciques dans les CSPs, dont les amplitudes et les durées répondaient à ces caractéristiques prédéterminées.

Pour ce faire, nous devions trouver un équilibre entre la puissance de sortie du laser MP et le nombre d'itérations effectuées sur chaque CSP, de façon à transmettre suffisamment d'énergie pour que puisse s'effectuer la photolyse, sans toutefois induire de phototoxicité. Nous avons testé les puissances de sortie de 10, 20, 30 et 40% de la puissance totale du laser MP. Nous avons observé que si la puissance de sortie du laser MP était supérieure à 30% de sa puissance totale, nous n'avions que très peu de marge de manœuvre quant au nombre d'itérations que nous pouvions effectuer sans altérer le métabolisme des CSPs : avec une puissance de sortie de 40%, 4 à 5 itérations étaient suffisantes pour induire des élévations calciques qui ne revenaient pas au niveau de base avant plusieurs minutes et il nous était par la suite

impossible d'induire des élévations calciques par la libération de NTs dans ces cellules. Ceci porte à croire que le fonctionnement normal de la préparation était compromis par de telles stimulations et que nous avons probablement induit des phénomènes cytotoxiques. D'autre part, avec une puissance de sortie de moins de 20% du laser MP, le nombre d'itérations nécessaires pour obtenir des changements calciques dans les CSPs devenait très grand (de l'ordre de 120) et nécessitait plus de temps ($1.12 \mu\text{s} / \text{pixel}$) pour effectuer la photolyse dans toutes les CSPs d'une même jonction (en moyenne 5 CSPs/JNM).

Nous avons donc induit les petites élévations calciques (moyenne : $63 \pm 11 \% \Delta F/F$; $N = 3$, $n = 10$; figure 2, A et B) à l'aide de 10 ou 20 itérations de la zone d'intérêt couvrant les CSPs ($12.5 * 35.4 \mu\text{m}$), avec une puissance de sortie de 20% du laser multiphoton. Nous débutons par l'essai de 10 itérations et si ce nombre s'avérait insuffisant pour induire une élévation calcique des CSPs (suite à une analyse en ligne), nous répétons le protocole de photolyse, en utilisant cette fois 20 itérations.

Quant à elles, les grandes élévations calciques (moyenne : $283 \pm 32 \% \Delta F/F$; $N = 3$, $n = 9$; Figure 2, C et D) étaient évoquées par 30 itérations à 30% de la puissance totale de sortie du laser.

À la fin de chaque expérience, l'intégrité physiologique des CSPs était vérifiée en procédant à une stimulation du nerf moteur (40 Hz / 30 s), pour nous assurer que celles-ci répondaient toujours à la libération de NTs.

Figure 2 : Élévations de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs, induites par la photolyse de Ca^{2+} encagé à l'aide du laser multiphoton

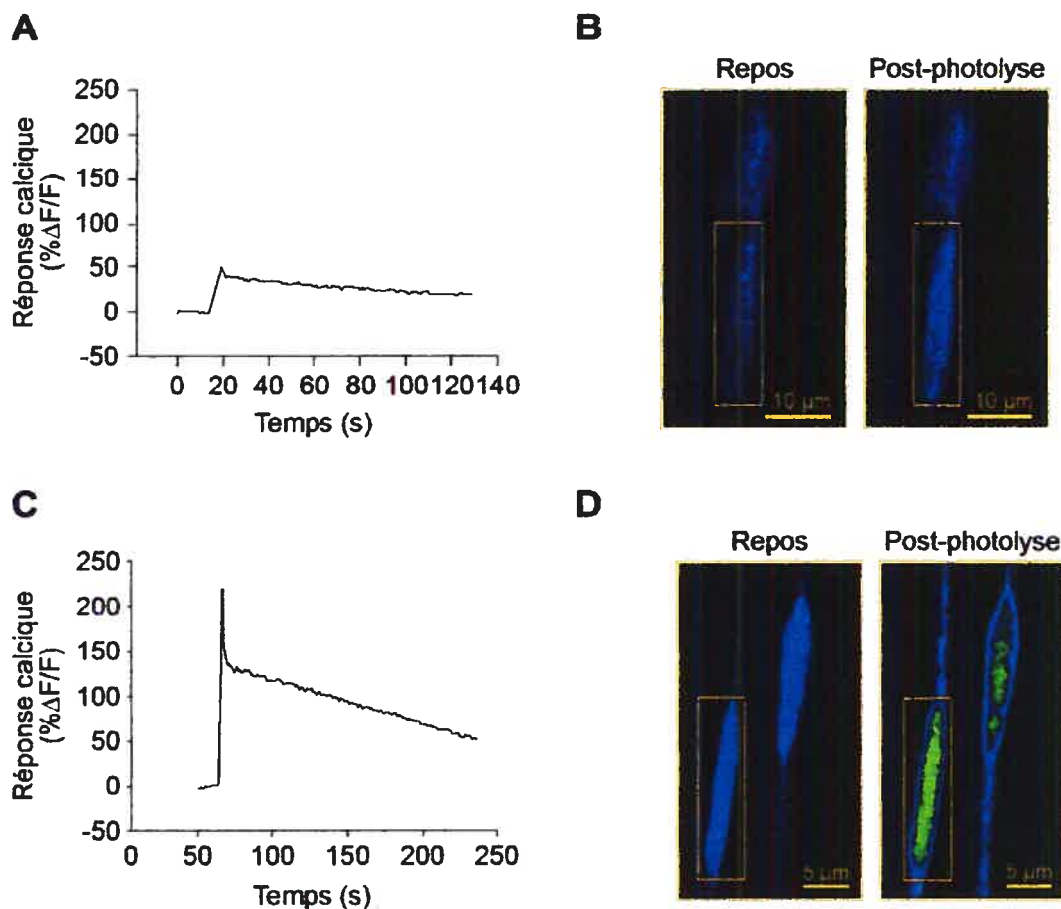


Figure 2 : A. Tracé représentant les changements calciques d'une CSP ayant subi 20 itérations à 20 % de la puissance de sortie du laser multiphoton ($\lambda=730$ nm; petite réponse calcique). B. Images de la CSP dont les changements calciques sont montrés en A, avant (repos) et immédiatement après la photolyse de DMNP-EDTA à l'intérieur de la région d'intérêt, délimitée par le rectangle orangé (post-photolyse). Les images sont montrées en fausses couleurs (le bleu signifie un bas niveau et le jaune, vert et rouge, des niveaux respectivement plus élevés) et sont obtenues suite à l'excitation du Fluo 3 AM à l'aide du laser argon (488 nm). Notez la plus grande intensité de la fluorescence post-photolyse, indiquant qu'il y a eu relâche de Ca^{2+} au niveau de la CSP. C. Changements de la $[Ca^{2+}]_i$ d'une CSP ayant subi 30 itérations à 30 % de la puissance de sortie du laser multiphoton ($\lambda=730$ nm; grosse réponse calcique). D. Images de la CSP dont les changements calciques sont montrés en C. La CSP utilisée pour les mesures calciques montrées en C est celle qui se trouve à l'intérieur du rectangle orangé, qui délimite la région d'intérêt qui a été balayée par le laser multiphoton. Notez l'augmentation de l'intensité de la fluorescence (passage du bleu au vert) au niveau du corps cellulaire de la CSP, indiquant une importante relâche calcique. La cellule de droite (non-encadrée) a aussi subi la photolyse. Sa réponse calcique n'est pas représentée ici afin de ne pas surcharger la figure.

4.3.2 Les paramètres de photolyse utilisés pour évoquer les élévations calciques dans les CSPs n'affectent pas l'homéostasie calcique des terminaisons nerveuses

La technique de chargement du DMNP-EDTA AM et du Fluo-3 AM permet à ces deux substances de s'introduire dans tous les compartiments cellulaires de notre préparation. Puisque les élévations calciques au niveau des terminaisons nerveuses sont intimement associées à la quantité de neurotransmetteur relâché, nous devons nous assurer que l'induction de réponses calciques dans les CSPs par la photolyse multiphoton n'entraînait pas d'élévation calcique dans les terminaisons nerveuses, situées tout juste sous le corps cellulaire des CSPs.

Afin de pouvoir visualiser les changements calciques présynaptiques, nous avons spécifiquement chargé l'indicateur calcique Calcium Green -1 dextran dans les terminaisons nerveuses à partir du bout coupé des axones moteurs, puis nous avons introduit le DMNP-EDTA AM dans la préparation tel que décrit dans la section 4.2.1.1 (Matériel et Méthodes), en omettant cependant le chargement du Fluo-3 AM.

Tout d'abord, nous avons montré l'intégrité des TN suite au chargement du Calcium Green et du DMNP-EDTA, en procédant à une stimulation du nerf moteur (40 Hz/10sec ; Figure 3A). Il a déjà été montré que ces paramètres de stimulation induisent une grande entrée de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses (Robitaille et Charlton, 1992), qu'il nous a été possible de détecter à l'aide du Calcium Green -1 dextran (Figure 3B et C). Il est à noter que la présence du DNMP-EDTA ne change en rien les réponses obtenues dans ces conditions. De plus, le fait d'évoquer une

élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les TN, nous assure le chargement optimal du Ca^{2+} sur le DMNP-EDTA pour des conditions de photolyse idéales.

Nous avons ensuite montré que le protocole de photolyse utilisé pour induire les élévations calciques dans les CSPs ne provoquait aucun changement de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les terminaisons nerveuses. Nous avons soumis les terminaisons nerveuses à deux fois le nombre d'itérations nécessaires pour évoquer les grandes réponses calciques dans les CSPs (60 itérations), en utilisant la même taille de région d'intérêt que celle employée pour la photolyse à l'intérieur des CSPs. Malgré le nombre élevé de balayages effectués directement au niveau des terminaisons nerveuses et la puissance utilisée, il nous a été impossible de détecter des changements calciques à l'intérieur de celles-ci dans ces conditions (Figure 3A et C).

Ainsi, le double des itérations nécessaires à évoquer des élévations calciques de plus de 200% $\Delta F/F$ dans les CSPs n'ont pas réussi à causer d'élévation calcique détectable des terminaisons nerveuses. Il est à noter que pour ces contrôles, le focus du laser MP était effectué directement au niveau de l'élément présynaptique, ce qui n'est pas le cas lors de la photolyse effectuée dans les CSPs. Sachant cela, la possibilité de photoactivation du DMNP-EDTA des TN lors de la photolyse dans les CSPs est pratiquement impossible et nous pouvons dire que les paramètres utilisés pour la photolyse de Ca^{2+} dans les corps cellulaires des CSPs n'affecte pas le Ca^{2+} présynaptique.

Figure 3 : Il n'y a aucun changement de la $[Ca^{2+}]_i$ des terminaisons nerveuses induit par les paramètres maximaux de photolyse utilisés

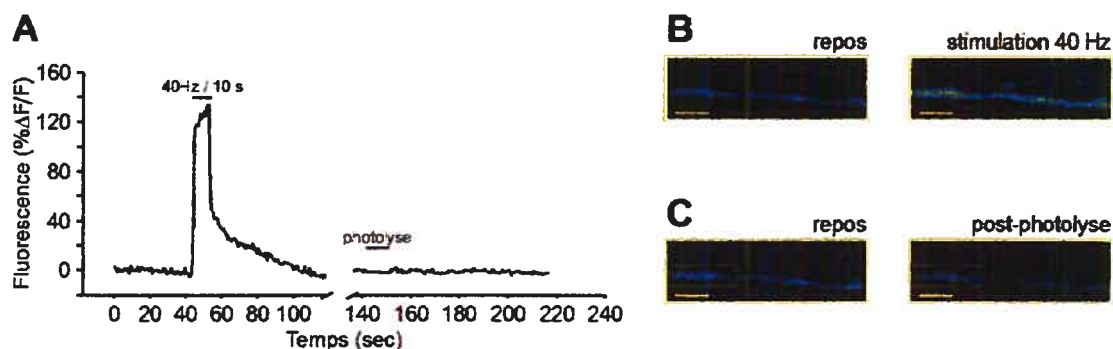


Figure 3. A. Changements calciques intracellulaires d'une terminaison nerveuse mesuré par le Calcium Green, suite à l'entrée de Ca^{2+} provoquée par la stimulation du nerf moteur de la préparation (40 Hz / 30 s), puis à un protocole de photolyse de 60 itérations à 30% de la puissance de sortie du laser multiphoton. B. Images de la même terminaison nerveuse, au repos et au début de la stimulation du nerf moteur. Les images sont présentées en fausses couleurs, pour lesquelles le bleu indique un bas niveau de Ca^{2+} et le vert, des niveaux plus élevés. C. Changements de la concentration calcique intracellulaire de la terminaison nerveuse, avant et immédiatement après 60 itérations (le double du nombre utilisé pour produire les grandes réponses gliales) à 30% de la puissance totale de sortie du laser multiphoton. On note qu'il n'y a aucune augmentation détectée dans l'intensité de la fluorescence mesurée à l'intérieur du cadre délimitant la région de photolyse. Barre de calibration : 10 μm .

4.3.3 L'exposition au laser multiphoton en l'absence de DMNP-EDTA n'a pas d'effet sur la transmission synaptique

Nous avons effectué un autre contrôle afin de nous assurer que le protocole de photolyse du laser multiphoton n'avait pas d'effet sur la transmission synaptique en l'absence du composé encagé. Nous avons procédé au chargement de la préparation avec le Fluo-3 AM, mais avons omis le DMNP-EDTA AM (concentrations de pluronic et DMSO identiques à celles utilisées pour les expériences). Nous avons ensuite enregistré la taille des PPMs évoqués par la

stimulation du nerf moteur de la préparation, avant et après l'application du protocole de photolyse de 30 itérations à 30% de la puissance de sortie du laser multiphoton (utilisé pour induire les réponses calciques $\geq 200\% \Delta F/F$).

En l'absence de DMNP-EDTA, il nous a été impossible d'évoquer des élévations calciques dans les CSPs et la stimulation de la préparation par le laser multiphoton n'a pas causé de changements dans l'amplitude des PPM évoqués par la stimulation du nerf moteur de la préparation (Figure 4). L'amplitude contrôle des PPM était de 0.83 ± 0.33 mV et l'amplitude à la fin de l'enregistrement (+ de 40 minutes) était de 0.77 ± 0.26 mV ($P=0.601$; $N=3$).

Figure 4 : En l'absence de DMNP-EDTA, l'exposition de la préparation au laser multiphoton ne provoque pas de changements de l'amplitude des PPMs

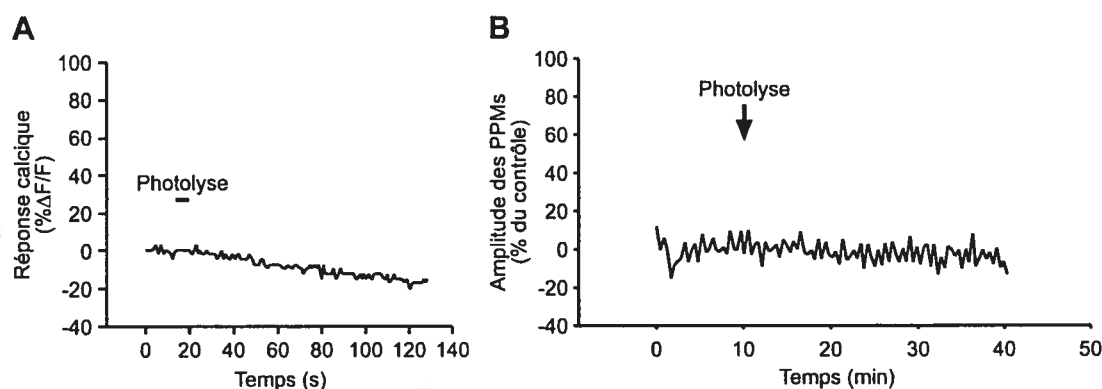


Figure 4. A. Fluorescence d'une CSP avant et après la photolyse par le laser multiphoton (30 itérations à 30% de la puissance de sortie totale du laser), en l'absence du DMNP-EDTA. N.B. L'absence d'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ de la cellule. La pente observée indique une légère détérioration photo-induite de l'indicateur calcique (bleaching). B. Lorsque le DMNP-EDTA n'est pas chargé dans la préparation, l'exposition des CSPs au laser multiphoton (mêmes paramètres que pour évoquer les grosses réponses calciques) ne provoque aucun changement de la taille des potentiels de plaque motrice enregistrés.

4.3.4 L'élévation maximale et non-spécifique de la concentration calcique intracellulaire des CSPs induit une potentialisation de la transmission synaptique

Tel que montré dans le chapitre deuxième, l'application de thapsigargin, un inhibiteur des pompes Ca^{2+} -ATPases des réserves calciques intracellulaires, cause une élévation maximale de la concentration calcique intracellulaire des CSPs (moyenne : $299 \pm 65\% \Delta F/F$, avec une durée de 12 ± 2 minutes ; Figure 5A). En effet, cette élévation est maximale car elle vide entièrement les réserves calciques intracellulaires et prévient le stockage subséquent du Ca^{2+} à l'intérieur de celles-ci en inactivant la pompe Ca^{2+} -ATPase qui en est responsable. Il a été montré au chapitre deuxième que l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des CSPs par la TG provoquait une potentialisation de la transmission synaptique à la JNM de grenouille. En effet, l'application de la TG sur notre préparation potentialise l'amplitude des potentiels de plaque motrice évoqués par la stimulation du nerf moteur de la préparation de $88 \pm 38\%$ (N=7 ; Figure 5B).

Figure 5 : La thapsigargin provoque une élévation maximale de la $[Ca^{2+}]_i$ des CSPs qui entraîne une augmentation de la taille des PPMs

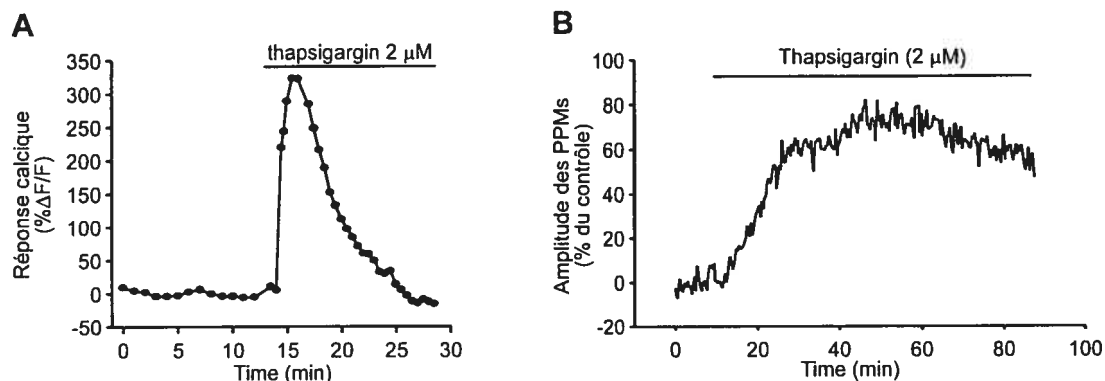


Figure 5. **A.** Augmentation calcique à l'intérieur d'une CSP lorsque la TG (2 μ M) est appliquée dans le bain. **B.** Lorsqu'elle est appliquée dans le bain, la TG produit, par l'intermédiaire de l'élévation calcique des CSPs, une potentialisation de l'amplitude des PPMs enregistrés de façon intracellulaire dans les fibres musculaires postsynaptiques. N.B. Les graphiques présentés en A et B ne proviennent pas de la même expérience

Ainsi, une élévation maximale de la concentration calcique intracellulaire des CSPs induit une potentialisation de la transmission synaptique. Or, il s'agit là d'élévations calciques gliales non-contrôlées, d'amplitude et de durée très importantes et peu probables en conditions physiologiques.

Nous allons maintenant utiliser la photolyse de Ca^{2+} engagé pour produire des élévations calciques gliales répondant à deux grandes catégories. D'une part, les grandes réponses calciques, qui seront comparables à celles qui sont rencontrées lors de l'application d'agonistes au niveau des CSPs ou de la stimulation du nerf moteur de la préparation (> 200 %ΔF/F). D'autre part, les petites réponses calciques (< 100 %ΔF/F), qui nous permettront de constater si les effets de potentialisation de la

transmission synaptique sont gradés, en comparant leurs effets à ceux des grandes réponses calciques.

4.3.5 Les grandes réponses calciques produites par la photolyse de Ca^{2+} encagé dans les CSPs induisent une potentialisation de la transmission synaptique

Nous avons procédé à l'enregistrement des PPMs (produits par la stimulation du nerf moteur de la préparation à 0.2 Hz) à l'aide d'une électrode intracellulaire insérée dans la fibre musculaire postsynaptique, près d'une JNM identifiée en lumière transmise. Ensuite, nous avons effectué la photolyse de Ca^{2+} encagé dans chacune des CSPs présentes à cette jonction (identifiées en lumière transmise et en fluorescence, grâce au Fluo-3 AM). Pour être considérées comme de grandes élévations calciques, les changements calciques obtenus dans les CSPs par la photolyse devaient tous avoir une amplitude $> 200\% \Delta F/F$ (moyenne : $283 \pm 33\% \Delta F/F$; $N=3$; $n = 9$; Figure 6A). L'analyse des PPMs suite à ces élévations calciques des CSPs par photolyse montre qu'ils subissent une augmentation (moyenne : $79 \pm 36\%$; $N=3$; Figure 6B) et que cette augmentation de l'amplitude des PPMs n'est pas différente de celle qui est observée en présence de la TG ($88 \pm 38\%$; $N=7$; $P=0.712$; test de t non-pairé).

Figure 6 : Les grandes réponses calciques induites par photolyse dans les CSPs induisent une potentialisation de l'amplitude des PPMs

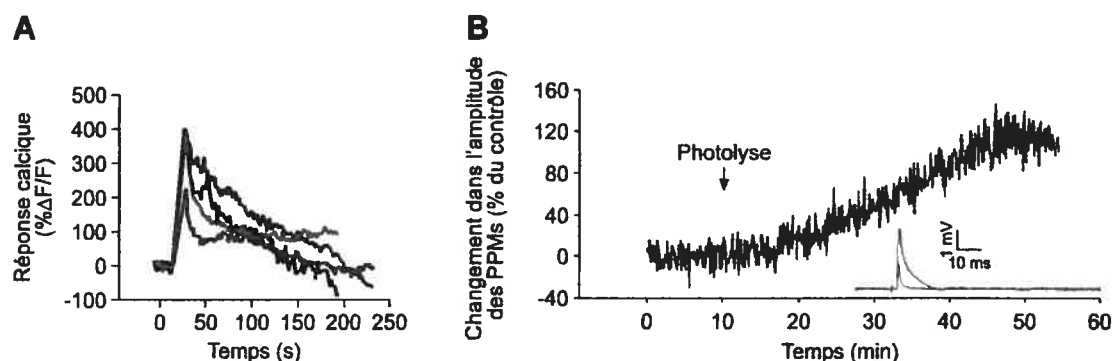


Figure 6. A. Changements calciques intracellulaires des 4 CSPs retrouvées à une JNM suite à la photolyse du DMNP-EDTA (30 itérations à 30% de la puissance totale de sortie du laser). B. Changements dans l'amplitude des PPMs (exprimé en pourcentage, par rapport au contrôle) enregistrés suite à l'élévation calcique des 4 CSPs de la JNM enregistrée (la même qu'en A). En médaillon : tracés de PPMs obtenus en contrôle (trace rouge) et au maximum de l'effet potentialisateur observé (trace bleue).

4.3.6 Les petites réponses produites par photolyse de Ca^{2+} encagé dans les CSPs induisent, elles aussi, une potentialisation de la transmission synaptique

Nous avons ensuite testé l'effet des augmentations calciques des CSPs de petite amplitude au niveau des PPMs. Nous avons procédé tel que décrit ci-haut pour l'enregistrement des PPMs et avons utilisé le protocole de 10 ou 20 itérations et une puissance de sortie de 20% du laser multiphoton pour la photolyse de Ca^{2+} encagé au niveau des CSPs. Dans ces conditions, l'amplitude des changements de fluorescence des CSPs ne dépasse pas 100 %ΔF/F (moyenne de 63 ± 11 %ΔF/F ; N = 3 ; n = 10 ; Figure 7A). Suite à ces petites réponses calciques au niveau des CSPs, l'analyse de

l'amplitude des PPMs a montré que ceux-ci subissaient aussi une potentialisation (moyenne : $83 \pm 36\%$; $N=3$; Figure 7B).

La potentialisation de la transmission synaptique obtenue suite aux petites élévations calciques n'est pas différente de celle qui est observée suite à l'application de TG dans le bain, ou la photolyse de Ca^{2+} dans les CSPs (grandes réponses calciques): $P=0.279$; $N=5$, ANOVA. Tous les schèmes d'élévations calciques utilisés produisent donc une potentialisation semblable de la transmission synaptique de notre préparation.

Figure 7 : Les petites élévations calciques intracellulaires des CSPs induisent une potentialisation de la transmission synaptique

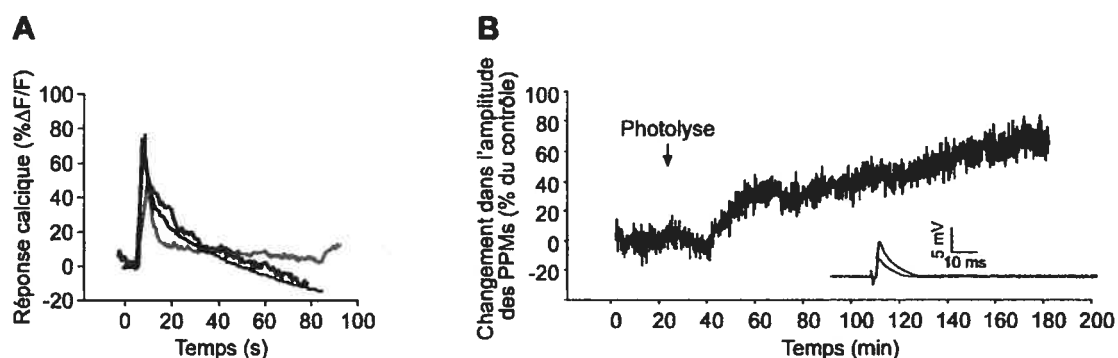


Figure 7. A. Décours temporel des élévations calciques des 3 CSPs d'une JNM, suite à un protocole de photolyse de 10 itérations à 20% de la puissance totale de sortie du laser multiphoton. B. À la même JNM qu'en A, changements de l'amplitude des PPMs enregistrés suite à l'induction de faibles changements calciques gliaux au niveau des 3 CSPs qui recouvraient la JNM (changements exprimés en pourcentage par rapport au niveau du contrôle). En médaillon : traces des PPMs enregistrés en contrôle (rouge) et au maximum de l'effet observé (bleu).

4.3.7 Il n'y a pas de corrélation directe entre la taille des réponses calciques gliales, leur durée et les effets observés au niveau de la transmission synaptique

Une potentialisation similaire de la transmission synaptique a été obtenue malgré les différences en amplitude et en durée des élévations calciques gliales. Le tableau 1 résume les amplitudes et les durées des réponses calciques gliales et leurs effets sur la taille des PPMs

Tableau 1 : Amplitude et durée des différentes réponses calciques gliales et leurs effets potentialisateurs au niveau de l'amplitude des PPMs

	Thapsigargin	Petites réponses Ca ²⁺ photo-induites	Grandes réponses Ca ²⁺ photo-induites
Amplitude moyenne des réponses calciques des CSPs (% $\Delta F/F$)	299 \pm 65 (N = 7; n = 9)	63 \pm 11 (N = 3 ; n = 10)	283 \pm 33 (N = 3 ; n = 9)
Durée Moyenne des réponses calciques des CSPs (s)	720 \pm 120 (N = 7; n = 9)	70 \pm 9 (N = 3 ; n = 10)	167 \pm 19 (N = 3 ; n = 9)
Aire sous la courbe des réponses calciques des CSPs (% $\Delta F/F \cdot s$)	171 189 \pm 31 475 (N = 7; n = 9)	2 012 \pm 688 (N = 3 ; n = 10)	38 187 \pm 9 701 (N = 3 ; n = 9)
Augmentation des PPMs au maximum de l'effet (% du contrôle)	88 \pm 38 N = 7	83 \pm 36 N = 3	79 \pm 36 N = 3

Il n'y a pas de différences significative entre le pourcentage d'augmentation de l'amplitude des PPMs à travers les trois conditions testées (0.279 ; ANOVA).

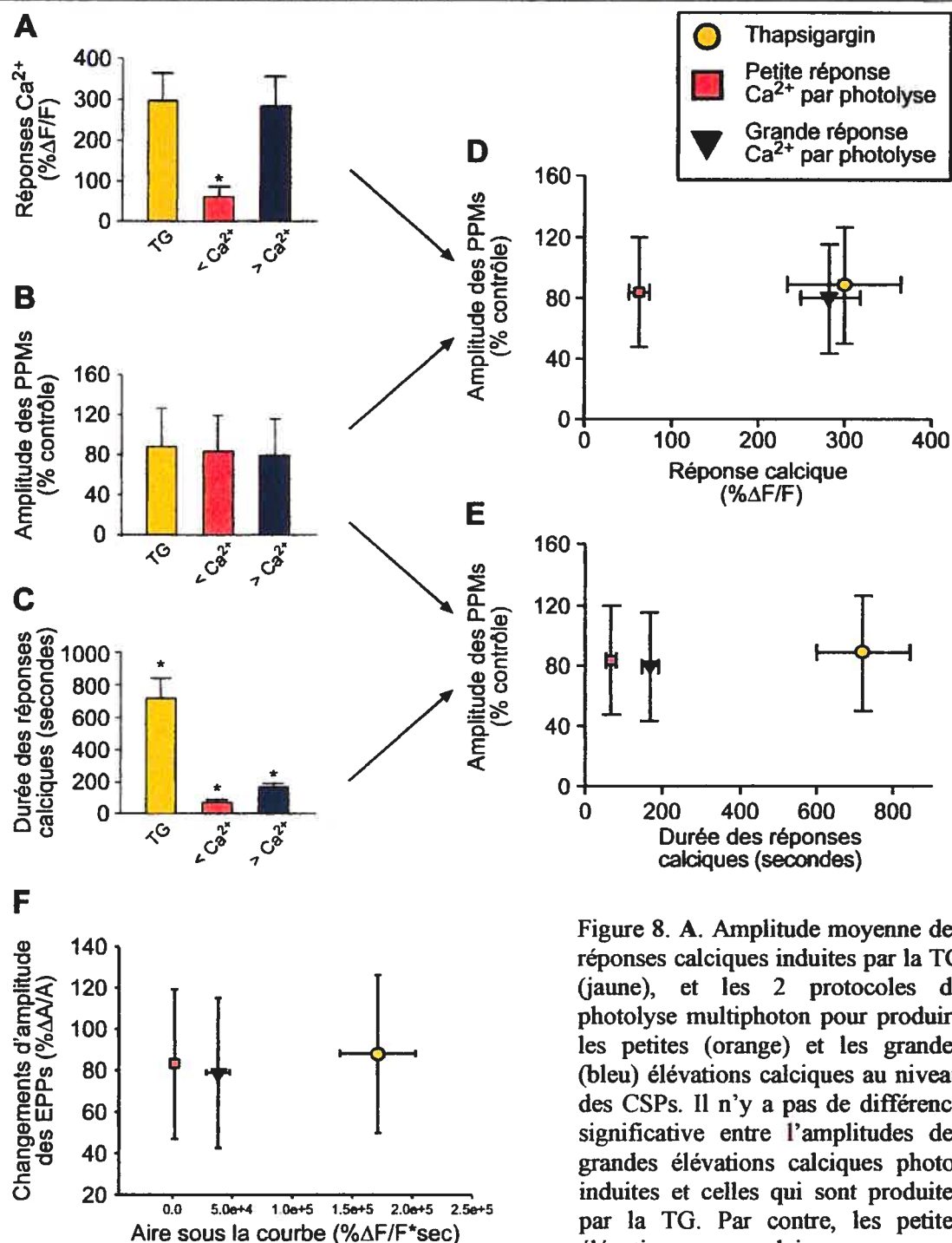
Il y a cependant des différences dans l'amplitude des petites réponses calciques photo-induites lorsqu'elles sont comparées aux grandes réponses calciques photo-induites (P = 0.009, ANOVA suivie d'un test de Tuckey) et aux réponses obtenues avec l'application de TG (P = 0.005, ANOVA suivie d'un test de Tuckey).

L'amplitude des grandes réponses calciques photo-induites et celles qui sont induites par la TG ne sont quant à elles pas différentes ($P = 0.962$, ANOVA suivie d'un test de Tuckey).

D'autre part, il existe une différence significative entre les durées des trois types de réponses calciques gliales ($P < 0.001$, ANOVA suivie d'un test de Tuckey). Les mesures de l'aire sous la courbe des réponses calciques gliales dans les trois conditions testées sont elle aussi différentes entre elles ($P < 0.001$ ANOVA, suivie d'un test de Dunn).

La figure 8 résume les données d'amplitudes, de durées et d'aire sous la courbe des réponses calciques gliales ainsi que les changements moyens dans l'amplitude des PPMs observés dans les trois conditions de références : TG, petites et grandes élévations calciques photo-induites. Malgré les différences importantes dans l'amplitude et la durée des élévations calciques gliales ainsi que dans la quantité de Ca^{2+} libérée par les CSPs (évaluée par l'aire sous la courbe des réponses calciques gliales) dans les différentes conditions, on remarque que les effets potentialisateurs au niveau des PPMs restent les mêmes.

Figure 8 : Aucun changement significatif n'est observé dans la potentialisation de la transmission synaptique en fonction de la taille ou de la durée des élévations calciques gliales



significativement différentes des grandes élévations calciques photo-induites et de celles induites par la TG (*). Voir le texte pour les valeurs statistiques. **B.** Graphique montrant le pourcentage d'augmentation maximal de l'amplitude des PPMs dans les trois conditions étudiées : TG (jaune), petites (orange) et grandes élévations calciques photo-induites (bleu).

C. Durée moyenne des réponses calciques induites par la TG (jaune), et les 2 protocoles de photolyse multiphoton pour produire les petites (orange) et les grandes élévations calciques (bleu). La durée des trois types de réponses calciques gliales sont différentes entre elles. D. Relation entre le pourcentage d'augmentation de l'amplitudes des PPMs par rapport au contrôle et l'amplitude des réponses calciques gliales, selon leur mode d'induction. Malgré les différences d'amplitude observées pour les réponses calciques gliales, la potentialisation de la transmission synaptique reste inchangée. Les barres d'incertitude montrent la déviation standard. E. Relation entre le pourcentage d'augmentation de l'amplitude des PPMs par rapport au contrôle et la durée des réponses calciques, selon leur mode d'induction. Malgré les différences significatives dans la durée des réponses calciques gliales observées, la potentialisation de la transmission synaptique reste inchangée. Les barres d'incertitude montrent la déviation standard. F. Relation entre les changements dans l'amplitude des PPMs (relatifs au contrôle) et l'aire sous la courbe des réponses calciques gliales dans les trois conditions testées. Noter la grande différence dans la quantité de Ca^{2+} libéré par les trois approches, sans toutefois que les effets au niveau de la transmission synaptique ne soient différents.

4.4 Discussion du chapitre quatrième

Nous avons montré que la production d'élévations calciques de différentes amplitudes, sans l'activation de récepteurs au niveau des CSPs, induisent une même potentialisation de la transmission synaptique. Cette potentialisation est de même amplitude que celle qui est induite par la TG, un bloqueur de la pompe Ca^{2+} -ATPase des réserves intracellulaires.

À la différence des expériences décrites au chapitre deuxième utilisant la thapsigargin pour initier les changements calciques gliaux, la photolyse de Ca^{2+} engagé directement dans les CSPs, nous permet d'éliminer les interférences avec l'homéostasie calcique des terminaisons nerveuses et n'affecte pas le fonctionnement normal des réserves calciques gliales. Nous utilisons donc ici une méthode qui nous assure que les changements que nous induisons sont purement calciques et concentrés au niveau des CSPs.

4.4.1.1 Les réserves calciques gliales

L'idée que les réserves calciques gliales constituent un moyen de signalisation dans le phénomène de la TS avait déjà été formulée dans l'article présenté au chapitre deuxième (Castonguay et Robitaille, 2001), puisque celles-ci sont chargées de Ca^{2+} en situation de repos et prêtes à répondre aux stimuli qui pourraient leur être présentés. Les observations recueillies dans la présente étude

grâce à l'aire sous la courbe des réponses calciques gliales viennent appuyer ces conclusions.

Les caractéristiques d'amplitude et de durée des petites réponses calciques photo-induites ont été choisies en fonction de reproduire les réponses calciques gliales obtenues par la faible activité synaptique. D'autre part, l'amplitude et la durée des grosses réponses calciques photo-induites correspondent aux réponses obtenues par l'application locale de neurotransmetteurs ou l'activité synaptique soutenue.

Lorsque l'on compare l'aire sous la courbe des deux types d'élévations calciques gliales photo-induites à celles qui sont induites par la TG, ces dernières sont considérablement plus importantes. En termes fonctionnels, cela signifie que les réserves calciques gliales peuvent soutenir plusieurs réponses calciques comparables à celles qui sont évoquées par l'application locale d'agonistes ou la transmission synaptique avant que leur contenu ne soit épuisé. De plus, en situation physiologique, les pompes Ca^{2+} -ATPases des réserves calciques gliales contribuent à les garder pleines, ce qui diminue encore la possibilité que ces dernières soient vidées et incapables de produire une réponse calcique appropriée si elles sont sollicitées.

L'amplitude des élévations calciques gliales est proportionnelle à la fréquence de stimulation de la JNM. Puisque les grandes réponses calciques photo-induites sont semblables à celles qui sont évoquées par des trains de stimulation retrouvés en conditions physiologiques, les niveaux calciques gliaux nécessaires pour activer la potentialisation de la TS devraient facilement être atteints en conditions physiologiques. En effet, tel que décrit au chapitre deuxième, lorsque l'on induit une dépression synaptique par la stimulation à haute fréquence de la préparation (10 Hz /

80 s) en ayant préalablement injecté du BAPTA au niveau des CSPs pour limiter leurs élévations calciques intracellulaires, nous obtenons une plus grande dépression synaptique (Castonguay et Robitaille, 2001). Cette observation montre que l'activation des CSPs peut provoquer des changements dans la plasticité rencontrée à la JNM.

4.4.1.2 *Mécanismes possibles*

Le déroulement temporel des changements de la TS exclut la possibilité que le Ca^{2+} glial soit lui-même directement responsable de l'augmentation de l'amplitude des PPMs. En effet, l'extrusion du Ca^{2+} hors des CSPs à la suite de leurs élévations calciques pourrait créer une accumulation de Ca^{2+} autour des terminaisons nerveuses et ainsi induire une potentialisation de la TS. Or, les changements observés au niveau de l'amplitude des PPMs durent plusieurs dizaines de minutes, ce qui est incompatible avec une élévation transitoire (quelques dizaines de secondes) de la concentration calcique près des terminaisons présynaptiques.

D'autre part, le déclenchement des changements de la TS que nous observons ne semble pas être lié à l'amplitude des changements calciques gliaux. En effet, malgré les différences importantes dans la taille et la durée des élévations calciques des CSPs, les effets mesurés au niveau de la transmission synaptique restent les mêmes. Il semble donc qu'un seuil d'élévation calcique doive être atteint au niveau des CSPs pour que soit initiée la potentialisation de la TS. Lorsque ce seuil est atteint, la même série d'événement semble avoir lieu pour mener à une même potentialisation de la TS.

Pour ces raisons, l'intervention d'une cascade Ca^{2+} -dépendante de messagers seconds gliaux capable d'induire une potentialisation de la TS pourrait expliquer nos observations.

Des résultats obtenus dans notre laboratoire indiquent que les prostaglandines pourraient, au moins en partie, jouer ce rôle. En effet, la phospholipase A_2 et les cyclooxygénases, des enzymes nécessaires à la production des prostaglandines sont présentes à la JNM de grenouille (Pappas D. et al., 1999). De plus, l'activité de la PLA_2 est Ca^{2+} -dépendante (via la calmoduline ; (Moskowitz et al., 1985)) et pourrait être activée par les élévations calciques gliales. De plus, des résultats préliminaires de notre laboratoire montrent qu'en présence d'aspirine, un inhibiteur des cyclooxygénases, la dépression synaptique (10 Hz / 80 s) est augmentée et la potentialisation synaptique (20 Hz / 120 s) est diminuée à la JNM de grenouille (travaux d'Audrée Pinard et Aurore Colomar, non-publiés à ce jour). Enfin, l'application de PgE_2 dans le bain (30-50 μM) induit une potentialisation de la transmission synaptique de 24% à la JNM de grenouille (Pappas D. et al., 1999).

Toutefois, l'effet des prostaglandines sur la TS dans ces conditions ne peuvent expliquer la totalité des effets potentialisateurs résultant des élévations calciques gliales, décrits dans ce chapitre (potentialisation de l'ordre de 80%). Il est probable que l'application de prostaglandines dans le bain ne soit pas aussi efficace à induire une potentialisation de la TS, que les prostaglandines produites directement au niveau des CSPs, près de leur site effecteur. D'autre part, puisque le Ca^{2+} est un messager second ubiquitaire, il est possible que les élévations calciques des CSPs puissent déclencher d'autres processus gliaux en parallèle d'une cascade des

prostaglandines et que plus d'une voie de signalisation soit impliquée dans la potentialisation de la TS gliale Ca^{2+} -dépendante. La présence d'autres voies de signalisation et leur activation différentielle dans le cas des petites et des grandes élévations calciques gliales pourrait expliquer que le décours temporel des changements induits par les faibles élévations calciques, bien que d'amplitude similaire, aient un décours temporel plus lent. Selon cette hypothèse nous pourrions penser que l'amplitude des changements gliaux pourrait moduler la cinétique des changements au niveau de la transmission synaptique et non la magnitude de ces changements.

Toutefois, il n'est pas obligatoire que l'effet potentialisateur au niveau de la TS passe par l'action d'une substance potentialisatrice. L'effet potentialisateur peut être le résultat de l'interruption ou de la diminution de l'activité d'une voie de signalisation inhibitrice. Par exemple, nous savons que le NO, un messager neuromusculaire qui diminue la TS, est produit de façon tonique à la JNM de grenouille (Thomas et Robitaille, 2001). Une diminution momentanée dans la production de ce messager seraient perçue comme une potentialisation de l'activité totale de la JNM. Cette possibilité est en accord avec les observations de la coexistence de mécanismes potentialisateurs et inhibiteurs d'origine gliale au niveau de notre préparation et du fait que plusieurs de ces mécanismes peuvent être activés simultanément.

4.4.1.3 Perspectives

Les expériences effectuées jusqu'à présent ont mesuré l'effet total de l'augmentation calcique de toutes les CSPs d'une même JNM sur la transmission synaptique. Or, il n'est pas impossible que toutes les CSPs d'une même JNM puissent avoir des effets différents au niveau de la portion de la TN qu'elles recouvrent. Il serait donc intéressant de mesurer l'effet individuel des CSPs d'une même jonction, afin de mieux isoler leur contribution aux changements observés pour l'ensemble de la JNM. Pour ce faire, l'utilisation d'une électrode focale mesurant les courants de plaque motrice (CPM) de la branche de la JNM couverte par la CSP subissant les changements calciques pourrait être envisagée. Ce faisant, nous pourrions avoir une indication de la contribution individuelle des CSPs dans les changements observés au niveau de la JNM, à l'aide d'une électrode intracellulaire et déterminer si les CSPs affectent la TS de manière similaire.

D'autre part, nous pourrions calibrer un indicateur calcique tel le Fluo 3-AM, afin d'avoir une estimation des concentrations calciques intracellulaires atteintes lors des élévations calciques photo-induites. De cette façon, nous pourrions raffiner notre approche et peut-être être en mesure de déterminer la concentration du seuil calcique à atteindre dans les CSPs pour déclencher la potentialisation de la TS.

De plus en comparant les élévations de la $[Ca^{2+}]$ gliale obtenues par photo-induction et les $[Ca^{2+}]$ gliales atteintes lors de divers patrons d'activité synaptique nous pourrions déterminer dans quelles conditions la potentialisation de la TS gliale Ca^{2+} -dépendante sera recrutée.

Puisque les cyclooxygénases sont présentes dans les CSPs de la JNM, l'utilisation d'inhibiteurs des cyclooxygénases (ex. indométhacin, aspirine...) dans le bain, lors de l'induction de dépression ou potentialisation synaptique devrait en principe réduire ou abolir la potentialisation de la TS gliale Ca^{2+} -dépendante et contribuer à augmenter la dépression, ou diminuer la potentialisation. Ces expériences peuvent s'avérer utile pour déterminer le niveau d'implication des prostaglandines dans la potentialisation observée.

4.5 Conclusion du chapitre quatrième

Nous avons montré que des élévations purement calciques des CSPs conduisent à une potentialisation de la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire de grenouille, probablement via l'activation d'une cascade de messagers seconds. Dans toutes les conditions testées à l'intérieur de cette étude, le seuil du déclenchement de la potentialisation de la TS a été atteint. De plus, la potentialisation de la TS ne varie pas en fonction de l'amplitude des changements calciques gliaux. Conséquemment, si une cascade de messagers seconds en est responsable, ses effecteurs sont saturés dans toutes les conditions testées.

4.6 *Références du chapitre quatrième*

- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca^{2+} Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21: 1911-1922.
- McCray JA, Trentham DR (1989) Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annual Review of Biophysics & Biophysical Chemistry* 18: 239-270.
- Moskowitz N, Andres A, Silva W, Shapiro L, Schook W, Puszkin S (1985) Calcium-dependent binding of calmodulin to phospholipase A2 subunits induces enzymatic activation. *Arch Biochem Biophys* 241: 413-417.
- Pappas D., hazrati L.N., and Robitaille, R. Arachidonic acid and PgE2 as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. *Society for neuroscience abstracts* 25[part 1], 1256. 1999.
- Robitaille R, Charlton MP (1992) Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* 12: 297-305.
- Thomas S, Robitaille R (2001) Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21: 1087-1095.

5 Chapitre cinquième : Discussion générale

Dans cette thèse, nous avons montré que :

- 1) La vidange des réserves calciques des CSPs induit une potentialisation de la transmission synaptique à la JNM de grenouille.

Nous savions déjà que les CSPs pouvaient diminuer l'efficacité de la synapse, suite à une activation sélective des protéines G des CSPs (Robitaille, 1998). La démonstration que ces cellules sont aussi en mesure de potentialiser l'efficacité synaptique ouvre la porte à l'existence d'un système intégré de modulation de l'activité synaptique par la glie, à l'intérieur duquel les CSPs peuvent influencer à la hausse ou à la baisse l'activité de la JNM.

- 2) Nous voulions utiliser la XeC afin de montrer l'implication des récepteurs à l' IP_3 dans la relâche du Ca^{2+} des réserves calciques gliales. Or, nous avons montré qu'en plus d'interagir avec le fonctionnement du récepteur à l' IP_3 , la XeC est en mesure d'inhiber le fonctionnement de la pompe Ca^{2+} -ATPase des réserves calcique intracellulaires (SERCA).

Ce constat indique qu'il faut faire montre d'une grande prudence lors de l'utilisation de ce composé, afin de détecter si celui-ci n'a pas d'influence sur les ATPases présentes au niveau des cellules étudiées.

- 3) Des élévations purement calciques et sub-maximales suivant la photolyse de Ca^{2+} encagé au niveau des CSPs potentialisent la transmission synaptique de façon similaire à celle qui est observée après la vidange totale des réserves calciques gliales.

De plus, dans le cas des élévations calciques photo-induites, les changements calciques sont de l'ordre de ceux qui sont observés en conditions physiologiques, suite au fonctionnement normal de la JNM. Il semble donc possible que la modulation de la transmission synaptique par les CSPs de la JNM de grenouille puissent participer à l'activité synaptique totale *in vivo*.

Dans la discussion qui va suivre, nous parlerons des implications d'une telle modulation de la transmission synaptique à la JNM et de ses correspondances avec la modulation de la transmission synaptique dans le SNC.

De plus, l'apport des cellules gliales périssynaptiques à l'activité totale de la synapse sera discuté, en lien avec la nécessité de leur présence au niveau synaptique.

5.1 Les cellules gliales et la modulation de la transmission synaptique

De par leur localisation anatomique, les cellules gliales périssynaptiques sont physiquement associées aux synapses. Mais cette association physique seule n'implique pas un rôle physiologique actif des cellules gliales dans la transmission

synaptique. Afin de pouvoir influencer le fonctionnement de la synapse les cellules gliales périssynaptiques doivent :

- 1) Détecter la présence de neurotransmetteurs dans la fente synaptique
- 2) Être activées sous l'action des NTs endogènes
- 3) Induire en retour des changements de la TS

Plusieurs démonstrations de l'implication physiologique des cellules gliales dans la transmission synaptique ont été faites, tant dans le SNC que dans le SNP.

5.1.1 Cellules gliales périssynaptiques du SNC

L'implication des astrocytes de diverses régions du cerveau dans le phénomène de la transmission synaptique a été largement étudiée. Il a été montré que ces cellules détectent la libération de neurotransmetteurs et sont activées par ceux-ci (Porter et McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999; Araque et al., 2002).

De plus, les astrocytes, lorsqu'ils sont activés, sont en mesure de produire des gliotransmetteurs qui vont à leur tour influencer la transmission synaptique (Bezzi et al., 1998; Araque et al., 2000; Pasti et al., 2001; Newman, 2003). Cette influence peut se produire directement, par l'activation de récepteurs du neurone postsynaptique par les gliotransmetteurs, ou indirectement, par recapture de neurotransmetteurs (Bergles et Jahr, 1998; Anderson et Swanson, 2000) ou encore la stimulation de récepteurs

présynaptiques (Starke et al., 1989; Wilcox et Dichter, 1994; Thomas et al., 2000; Engelman et Macdermott, 2004).

L'activation gliale peut se traduire par des élévations calciques isolées à certains prolongements entourant un petit groupe de synapses, sans toutefois s'étendre à la cellule gliale entière. C'est le cas pour les cellules de Bergmann, les cellules gliales du cervelet, pour lesquelles il a été montré que la stimulation des fibres parallèles provoque des élévations calciques confinées à un prolongement glial interagissant avec un petit groupe de synapses (Grosche et al., 1999; Grosche et al., 2002). De même, au niveau des astrocytes de l'hippocampe, l'intensité de l'activité neuronale détermine si les élévations calciques astrocytaires seront limitées à un prolongement glial, à l'astrocyte entier ou si elles pourront se propager sous forme de vague à d'autres cellules gliales (Fellin et Carmignoto, 2004). Ainsi, les cellules gliales pérисynaptiques peuvent avoir des échanges locaux avec leurs terminaisons nerveuses associées, sans que l'activité globale de l'astrocyte ne s'en trouve modifiée.

Tel que décrit au chapitre premier, les astrocytes peuvent aussi communiquer entre eux par des élévations de leur concentration calcique intracellulaire sous forme de vagues calciques. Ainsi, l'activation astrocytaire initiée à une synapse isolée pourrait se propager à l'ensemble de l'astrocyte qui l'entoure, puis à d'autres astrocytes qui influenceront à leur tour les sites synaptiques auxquels ils sont associés.

Cette possibilité a été vérifiée par (Newman et Zahs, 1998), qui a montré que l'activité synaptique des neurones de la rétine était modifiée au passage d'une vague calcique. Il est donc envisageable que l'activité de synapses distantes puissent influencer le fonctionnement d'autres synapses via l'action des cellules gliales.

Cette constatation a des implications dans la gestion du transfert de l'information synaptique à l'intérieur de tout le rayon de propagation des vagues calciques autour d'un astrocyte. Ce réseau de communication glial pourrait servir à maintenir le groupe de neurones contactés par le syncytium glial dans un même état d'activation. Il pourrait aussi s'agir d'une façon de moduler l'information transmise à des synapses distantes, en fonction de l'activité se déroulant à l'intérieur d'un groupe de neurones contactés par le même réseau astrocytaire (Fellin et Carmignoto, 2004).

En effet, la propagation d'une vague calcique pourrait servir à modifier les propriétés membranaires d'un groupe de neurones distant, grâce à la libération Ca^{2+} -dépendante de gliotransmetteurs. Il a été montré qu'en agissant sur des récepteurs NMDA extrasynaptiques, la libération de glutamate astrocytaire au niveau des neurones de la région CA1 de l'hippocampe peut causer des courants entrant synchrones dans plusieurs neurones en même temps (Fellin et al., 2004). Ainsi, il est possible que lors d'une période d'activité neuronale intense, les astrocytes activés puissent agir en retour sur plusieurs neurones simultanément pour en synchroniser l'activité.

Il a aussi été montré que les astrocytes pouvaient influencer le flot sanguin cérébral en agissant sur le degré de constriction des vaisseaux contactés par les podocytes astrocytaires. En effet, des résultats obtenus au niveau de tranches de cortex de rats on montré que la dilatation des artérioles par l'activité neuronale est

dépendante des oscillations calciques astrocytaires induite par le glutamate (Zonta et al., 2003). D'autres évidences obtenues *in vivo* ont quant à elles montré qu'une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau d'un podocyte induit une constriction vasculaire (Mulligan et Macvicar, 2004).

D'autre part, l'intervention de la glie pourrait aussi influencer des changements plastiques comme la LTP et la LTD, pressentis pour jouer un rôle dans l'établissement de la mémoire et de l'apprentissage. En effet, les patrons de stimulation utilisés pour induire ces changements plastiques neuronaux utilisent des fréquences induisant la mobilisation calcique des cellules gliales (Dani et al., 1992; Porter et McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997). Il a par exemple été montré que les souris mutantes ne possédant pas la protéine gliale GFAP (mutants -/-) avaient une LTP augmentée dans la région CA1 de l'hippocampe (McCall et al., 1996). Une autre étude effectuée chez le rat a montré l'implication des cellules gliales dans l'expression de la plasticité à long terme au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. En condition contrôle, la stimulation téтанique du nerf sciatique induit la LTP des potentiels de champs des fibres nociceptives de type C. Suite à l'administration intrathécale de fluorocitrate (inhibiteur du métabolisme glial), la stimulation téтанique du nerf sciatique ne produit plus la LTP, mais une LTD des potentiels de champs des fibres de type C (Ma et Zhao, 2002).

Récemment, il a été montré par Serrano et al., que les cellules gliales de la région CA1 de l'hippocampe de rat étaient impliquées dans la dépression

hétérosynaptique. En effet, les stimuli conditionnants utilisés pour induire ce phénomène causent des élévations calciques dans la glie périssynaptique. Lorsque ces élévations sont prévenues par l'injection de BAPTA dans les cellules gliales, la dépression hétérosynaptique est diminuée et de plus courte durée (Serrano et al., 2003).

Ces études nous donnent des indices de l'implication des cellules gliales dans les fonctions cognitives supérieures telles que l'apprentissage et la mémoire. Cependant, il faut rester prudent dans l'interprétation de ces données, puisque jusqu'à maintenant, peu de données sont disponibles quant aux mécanismes d'intervention gliale dans ces phénomènes.

Ces possibilités restent donc à être vérifiées et appuyées de données quant aux modes d'intervention gliale utilisés. La versatilité des modes d'interaction synapse – glie permet de croire que toute une gamme d'influences et de modulations se produisent au niveau de réseaux neuronaux/gliaux dans le fonctionnement du SNC. Cependant, par leur architecture complexe et le nombre élevé des contacts synapse – glie des modèles d'étude du SNC, ceux-ci demeurent difficiles à analyser afin d'isoler les contributions purement gliales à leur fonctionnement.

5.1.2 Les cellules de Schwann périssynaptiques de la JNM

Pour notre étude, nous avons choisi de nous tourner vers une préparation *in situ* moins complexe et plus facilement accessible que les préparations du SNC pour la manipulation de ses différentes composantes : la jonction neuromusculaire. Cette synapse comporte trois principaux éléments cellulaires : la terminaison du neurone moteur présynaptique, la fibre musculaire postsynaptique et la cellule de Schwann périssynaptique. Au site de cette synapse, il est techniquement possible de stimuler le nerf moteur et d'enregistrer la dépolarisation subséquente au niveau de la fibre musculaire. De plus, à l'aide de différents moyens (application d'agonistes, injection spécifique, photolyse) il nous est possible d'activer sélectivement certaines facettes du métabolisme des CSPs. Toutes ces considérations rendent l'étude des interactions neurone-glie-neurone plus aisée au niveau de cette préparation.

Les cellules de Schwann périssynaptiques (CSPs) sont en très étroite apposition avec les terminaisons nerveuses présynaptiques et remplissent les trois conditions pour être considérées comme des partenaires synaptiques : elles détectent la libération de NTs, sont modulées par ceux-ci et induisent en retour des changements de l'activité synaptique.

De fait, il a déjà été montré à la JNM du muscle *cutaneus pectoris* de grenouille (*Rana pipiens*) que les CSPs détectent la libération de neurotransmetteurs grâce à leurs récepteurs de surface et produisent des élévations calciques intracellulaires en réponse à leur présence (Reist et Smith, 1992; Jahromi et al., 1992; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Bourque et Robitaille, 1998).

De plus, les CSPs sont en mesure de moduler l'activité synaptique, puisque l'activation de leurs protéines G induit une dépression de l'efficacité synaptique à la JNM (Robitaille, 1998).

Les travaux rapportés dans cette thèse, indiquent que les CSPs de la JNM de grenouille peuvent aussi potentialiser l'efficacité de la synapse de façon Ca^{2+} -dépendante. En effet, la vidange totale des réserves calciques intracellulaires des CSPs par la TG, ainsi que les élévations calciques sub-maximales photo-induites potentialisent de façon similaire l'efficacité de la synapse. Les résultats obtenus semblent indiquer qu'une cascade de messagers seconds Ca^{2+} -dépendante pourrait être à l'origine des effets potentialisateurs observés.

Les effets potentialisateurs des CSPs au niveau de l'activité de la JNM de grenouille décrits ici représentent seulement une partie des influences que peuvent exercer les CSPs sur la transmission synaptique à cette synapse. En effet, un système complexe d'interactions entre les éléments pré-, postsynaptique et glial permet de produire tantôt une potentialisation, tantôt une diminution de l'efficacité synaptique.

Malheureusement, à l'heure actuelle il est techniquement difficile de disséquer les différentes voies gliales de seconds messagers et montrer leur implication respective dans l'activité synaptique. Cependant, les travaux du laboratoire indiquent que l'activation des protéines G gliales mène à une dépression, tandis que l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des CSPs induit plutôt une potentialisation de l'efficacité synaptique.

Ainsi, il existe un niveau élevé de correspondance entre les mécanismes d'interactions neurone-glie-neurone au niveau des systèmes nerveux central et périphérique. Non-seulement les CSPs peuvent-elles être considérées comme des partenaires synaptiques au même titre que les astrocytes dans le SNC, mais les modes de fonctionnement rencontrés à la JNM pourraient orienter la recherche vers des mécanismes semblables au niveau du SNC.

5.1.2.1 Les réserves intracellulaires de la JNM

À la JNM, on retrouve trois principales réserves calciques intracellulaires: celles de la terminaison présynaptique, celles des fibres musculaires postsynaptiques et celles des CSPs. Les réserves postsynaptiques étant principalement impliquées dans le couplage excitation-contraction des fibres musculaires, notre attention s'est portée vers les réserves présynaptiques et gliales dans le contrôle de la libération de NTs.

À la lumière de nos études ces deux types de réserves semblent avoir des rôles bien définis et différents.

5.1.2.1.1 Les réserves calciques présynaptiques de la JNM

Nos résultats indiquent que le RE semble maintenir un bas niveau de Ca^{2+} en condition de repos. En effet, nous avons montré que dans ces conditions, la thapsigargin (TG), un inhibiteur de la pompe Ca^{2+} -ATPase de cette réserve, ne provoquait pas d'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des terminaisons nerveuses (Voir chapitre deuxième, (Castonguay et Robitaille, 2001). Ainsi il est peu probable que ces réserves servent de source importante de Ca^{2+} en condition basale.

Nous avons donc examiné la cinétique des élévations calciques intracellulaires présynaptiques à la suite du passage d'un potentiel d'action, ou d'un train de potentiels d'action et nous avons constaté que les réserves calciques présynaptiques assuraient la dispersion des élévations calciques présynaptiques. En effet, lorsque l'on bloque la pompe Ca^{2+} -ATPase, la clairance calcique présynaptique s'en trouve rallongée et on a montré que ceci cause une augmentation de la quantité de neurotransmetteurs libérés.

Lors de stimulation à haute fréquence prolongée, il a été montré que les réserves calciques du RE (alors chargées) sont impliquées dans le phénomène de « CICR » (Narita et al., 1998) et peuvent donc dans ces conditions servir de source de Ca^{2+} pour la terminaison nerveuse. Le Ca^{2+} ainsi libéré pourrait alors moduler la libération de NTs.

5.1.2.1.2 Les réserves calciques des CSPs

Quant à elles, les réserves calciques du RE glial semblent pleines au repos, tel que montré par l'importante élévation de leur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite suite à l'application de TG sur la préparation. Le Ca^{2+} des réserves gliales est libéré suite à l'activité synaptique, via la production d' IP_3 (Castonguay et Robitaille, 2001) et de façon fréquence-dépendante (Jahromi et al., 1992). Puisque ces réserves sont pleines en conditions de repos, prêtes à relâcher leur contenu lors d'une stimulation appropriée, il apparaît donc que leur fonction première en est une de signalisation.

De plus, le fait que l'activation gliale (i.e. la relâche de Ca^{2+} de leurs réserves intracellulaires) soit proportionnelle à la fréquence de l'activité de la synapse indique que les réserves calciques sont mobilisées lors d'activité synaptique à haute

fréquence. Or, certains phénomènes de plasticité synaptique à court terme (dépression, potentialisation post-tétanique) sont induits à des fréquences qui mobilisent les réserves calciques gliales. Puisque la mobilisation des réserves calciques gliales a en retour des effets sur la transmission synaptique, nous pouvons croire que lors de stimulation à haute fréquence, certains phénomènes de plasticité synaptiques seront modulés par l'intervention gliale.

5.1.2.2 *Actions potentialisatrices des CSPs*

Nous avons montré que les élévations calciques des CSPs induisent une potentialisation de la TS à la JNM de la grenouille *Rana pipiens*.

Si les changements de la TS que nous avons observé sont le résultat de l'activation d'une cascade de seconds messagers dépendante du Ca^{2+} , il devrait se produire des changements au niveau de la transmission synaptique lorsque le seuil d'activation de cette cascade est atteint. Nos résultats montrent qu'il n'existe pas de lien entre l'amplitude des élévations calciques gliales et les changements observés au niveau de la TS. En effet, les élévations calciques gliales maximales induites par la TG (vidange complète des réserves calciques) produisent les mêmes effets que les petites élévations calciques gliales photo-induites. Ainsi, nous pouvons dire que, à l'intérieur des paramètres testés 1) nous avons induit des élévations calciques gliales qui étaient supérieures au seuil d'activation de la cascade de messagers seconds dans toutes les conditions testées et 2) le système effecteur de cette cascade était saturé, même suite à son activation par les plus petites élévations calciques testées.

Il est intéressant de noter que le seuil d'activation de la potentialisation gliale Ca^{2+} -dépendante de la TS semble bas. Puisque la libération de NTs induit les élévations calciques gliales, ce seuil calcique pourrait facilement être atteint conséquemment à des patrons d'activité synaptique rencontrés physiologiquement.

Dans ce contexte, l'activation à bas seuil des mécanismes de potentialisation gliale Ca^{2+} -dépendants pourraient servir à contre-balancer les effets dépresseurs liés à l'activation des récepteurs couplés aux protéines G, qui constituent la majorité des récepteurs de surface des CSPs pour les NTs de la synapse. En effet, il a été montré que l'activation massive des protéines G des CSPs induit une dépression de l'efficacité synaptique (Robitaille, 1998). Ainsi, puisque des élévations calciques sont aussi produites par l'activation des protéines G (système de la PLC et production d' IP_3), un équilibre dynamique entre les mécanismes potentialisateurs et inhibiteurs pourrait exister.

Les prostaglandines sont pressenties pour induire la potentialisation de la transmission synaptique Ca^{2+} -dépendante à la JNM de grenouille. Il a été montré que la phospholipase A2 (PLA2), l'enzyme de synthèse de l'acide arachidonique (AA), est présente au niveau des CSPs et l'application de PgE_2 , un dérivée de l'AA par la voie des cyclooxygénases, potentialise l'amplitude des EPPs (Pappas D. et al., 1999). De plus, des travaux préliminaires montrent que l'indométhacine (un bloqueur des cyclooxygénases) prévient la potentialisation de la TS induite par la TG (travaux non-publiés). Puisque les cyclooxygénases sont Ca^{2+} -dépendantes, la production de PgE_2 pourrait être modulée par les élévations calciques gliales.

Il sera intéressant d'estimer les $[Ca^{2+}]_i$ atteintes au niveau des CSPs pour la suite de ce projet (par le calibrage d'indicateurs tels le Fluo 3-AM). Ceci permettrait de mesurer les concentrations calciques réellement atteintes au niveau des CSPs et ainsi d'avoir une meilleure discrimination du seuil calcique nécessaire pour enclencher les événements menant aux changements de la TS.

5.1.2.3 *Actions inhibitrices des CSPs*

Les cellules gliales peuvent non-seulement potentialiser mais aussi diminuer l'efficacité de la synapse, tel que démontré par Robitaille, 1998. Dans cette étude les protéines G des CSPs ont été activées de façon non-sélective par l'injection de GTPys, un analogue non-hydrolysable du GTP. La majorité des récepteurs de surface des CSPs sont couplés à des voies intracellulaires opérant via les protéines G : muscariniques, purinergiques et peptidergiques. En injectant le GTPys dans une CSP, on active donc en bloc la majorité des voies de signalisations connues s'y trouvant.

En utilisant ce protocole, on a certainement provoqué des élévations de la concentration calcique des CSPs, puisque l'ACh, l'ATP, l'adénosine et la muscarine, individuellement appliquées sur les CSPs, induisent des élévations calciques. Or, suite au protocole d'injection, une activation aussi massive des protéines G à l'échelle cellulaire a provoqué des changements biochimiques et des modifications importantes des capacités physiologiques des CSPs. Le résultat net observé au niveau des JNMs étudiées est une baisse de l'efficacité synaptique, malgré la présence d'élévations calciques gliales ayant un effet potentialisateur au niveau de la TS.

Ces données nous apprennent que, en plus de pouvoir potentialiser l'efficacité de la synapse, les CSPs possèdent aussi la capacité et les outils nécessaires pour produire une baisse de l'efficacité synaptique. Un messenger glial devant médier une action inhibitrice de la TS devait être diffusible, afin de pouvoir aller produire ses effets au niveau présynaptique et/ou glial. Un bon candidat pour assurer ce rôle serait l'oxyde nitrique (NO).

5.1.2.3.1 *Le NO*

Des pistes de solution sont apportées par les travaux de Lindgren et Laird (Lindgren et Laird, 1994), qui ont montré que le NO réduit l'amplitude des PPMs à la JNM du muscle sartorius de la grenouille *Rana pipiens*. Il était déjà connu que la NO synthase, l'enzyme de synthèse du NO est retrouvée au niveau de la plaque motrice des fibres musculaires postsynaptiques de la JNM (Kusner et Kaminski, 1996). Des travaux de notre laboratoire ont par la suite mis en évidence la présence de la NO synthase (type neuronale, induite par le Ca^{2+}) dans les CSPs à la JNM du *cutaneus pectoris* (Descarries et al., 1998), ouvrant ainsi la porte à une production de NO suivant la stimulation activité-dépendante des CSPs.

Une étude plus approfondie des voies d'action du NO a montré que cette substance agirait de façon constitutive en condition basale ainsi que dans la dépression induite par l'adénosine via l'activation d'une guanylate cyclase et la production de GMPc. Quant à la dépression à haute fréquence, elle serait attribuable à un mécanisme indépendant de la production de GMPc (Thomas et Robitaille, 2001).

Les mécanismes d'action du NO dans le contrôle de la libération de NTs demeurent inconnus dans notre préparation. Cependant, il a été montré dans les

cellules endothéliales de l'aorte humaine que le NO peut diminuer l'activité ATPase du facteur NSF (par nitrosylation) l'empêchant ainsi de désassembler les v- et t-SNARES, ce qui diminue leur disponibilité pour les rondes d'exocytose subséquentes (Matsushita et al., 2003) (Sollner et Sequeira, 2003).

Au niveau de l'endocytose, des données de notre laboratoire (travaux de Sébastien Thomas) on montré que le NO affecte l'endocytose rapide des vésicules synaptiques lors de la dépression synaptique. En effet, ce neuromodulateur ralentit la cinétique et réduit la quantité maximale d'endocytose. La participation du NO dans la dépression serait due à l'inhibition de l'endocytose, créant une rareté des vésicules prêtes à l'exocytose.

D'autre part, il a été montré au niveau de cellules d'hippocampe de rat en culture que le NO pourrait avoir une influence sur l'endocytose des vésicules synaptiques. Ainsi, dans cette préparation, il y a production postsynaptique de NO suite à la stimulation des récepteurs NMDA. Le NO étant une molécule diffusible, il pourrait aller agir au niveau présynaptique et stimuler une guanylate cyclase, entraînant la production de PIP2, qui a pour effet d'accélérer l'endocytose des vésicules synaptiques (Micheva et al., 2003).

5.1.2.3.2 *Le glutamate*

La présence d'un système de régulation de la transmission synaptique par le glutamate a été mis en évidence par Pinard et al. (2003) dans notre préparation. En effet, l'application de glutamate à la JNM de grenouille est liée à une diminution de l'efficacité synaptique. Il a été montré que les récepteurs métabotropiques au glutamate sont situés au niveau de la fibre musculaire, tandis que les CSPs possèdent

le transporteur au glutamate. Ce dernier pourrait permettre aux CSPs de terminer l'action du glutamate en diminuant sa concentration dans la fente synaptique, ou alors de le stocker en prévision d'une relâche subséquente. Les origines (glie et/ou terminaison présynaptique) et les mécanismes d'action du glutamate dans la diminution de l'efficacité synaptique restent à déterminer. Le modèle proposé repose sur la production d'un messager pouvant diffuser et agir en diminuant la relâche de neurotransmetteurs de la terminaison nerveuse suite à l'activation des mGluRs postsynaptiques (Pinard et al., 2003). Le NO est un bon candidat pour assurer ce rôle, puisque la NO synthase est présente dans le muscle de notre préparation (Descarries et al., 1998) et qu'il a été montré que ce neuromodulateur diminue la relâche de neurotransmetteurs et agit dans le phénomène de dépression synaptique, tel que décrit à la section précédente (Thomas et Robitaille, 2001). De plus, des données récentes de notre laboratoire (travaux de Audrée Pinard), ont montré que les effets du glutamate passent effectivement par la production de NO, puisque si on inhibe la NO synthase ou que la préparation est mise en présence d'un chélateur de NO, il n'y a plus d'effets dépresseurs du glutamate.

5.1.2.4 Les effets de la Xestospongine C sur les réserves calciques de la JNM de grenouille

Nous avons montré qu'au niveau de notre préparation, la XeC n'avait pas que des effets sur le fonctionnement du récepteur à l'IP₃, mais aussi sur la pompe Ca²⁺-ATPase des réserves calciques gliales et présynaptiques (voir chapitre troisième).

Au niveau des CSPs, la XeC inhibe le fonctionnement des ATPases des réserves intracellulaires. Ainsi, il faut faire montre d'une grande prudence lors de l'utilisation de ce composé puisque les effets d'inhibition de l'activité du récepteur à l'IP₃ peuvent facilement être confondus avec ceux de l'inhibition des ATPases des réserves. En effet, dans les deux situations nous notons l'absence d'élévation calcique des CSPs suite à la stimulation de voies menant à leur libération. Or, cette absence d'élévation calcique aurait pu être le résultat de l'inhibition du récepteur à l'IP₃, mais aussi de la vidange des réserves via l'inhibition de leurs pompes ATPases.

De même, au niveau de l'élément présynaptique, la XeC inhibe les ATPases des réserves intracellulaires, tel que montré par un ralentissement de la clairance calcique des terminaisons suite au passage d'un potentiel d'action (chapitre troisième). Puisque ces réserves intracellulaires n'ont pas un contenu calcique élevé au repos, l'application de XeC ne produit pas d'effets notables au repos, mais la diminution de la capacité tampon de la terminaison présynaptique s'observe lors de la stimulation de la préparation.

Puisque les réserves présynaptiques ne sont pas sous le contrôle des récepteurs à l'IP₃, mais plutôt des récepteurs à la ryanodine, le fait que la XeC y produise des effets apporte une confirmation supplémentaire de sa non-spécificité envers le récepteur à l'IP₃.

5.2 Les CSPs effectuent un contrôle balancé et intégré de l'efficacité synaptique

Comment s'effectue le contrôle balancé des effets gliaux sur la transmission synaptique et quels sont les mécanismes qui déterminent une résultante potentialisatrice ou inhibitrice des CSPs sur la transmission synaptique ?

Il doit exister dans les CSPs une méthode de contrôle qui permette de passer d'une influence potentialisatrice vers une influence inhibitrice et vice-versa.

Puisque l'influence des CSPs sur la TS est activité-dépendante, un tel mécanisme de régulation pourrait aussi l'être. Par exemple, un neuro- transmetteur ou modulateur relâché lors de l'activité synaptique pourrait activer une cascade de messagers seconds ayant pour effet de changer la réponse d'autres récepteurs de surface des CSPs à leurs neurotransmetteurs.

La substance P (SP), un peptide présent à la JNM de grenouille (Matteoli et al., 1990) et libéré par les vésicules denses suite à des stimulations à haute fréquence pourrait tenir ce rôle. Il a été montré par (Bourque et Robitaille, 1998) que l'application locale de SP induit des élévations calciques dans les CSPs, via l'activation du récepteur NK-1. Or, les réponses calciques obtenues après l'application de SP, soit par la stimulation du nerf moteur de la préparation ou par l'application de muscarine étaient à toutes fins pratiques abolies, tandis que les réponses suite à l'application d'ATP étaient grandement diminuées (Bourque et Robitaille, 1998). Cet exemple montre que la SP pourrait jouer un rôle régulateur

important des réponses calciques gliales en changeant la réponse des récepteurs muscariniques et purinergiques à leur agoniste.

Le mécanisme d'action de la SP pourrait passer par l'activation d'une PKC. En effet, des données du laboratoire suggèrent que l'action de la SP passe par cette kinase, puisque la présence d'un bloqueur de la PKC prévient les effets de la SP sur les réponses à la muscarine et l'ATP (K. Olofsdotter, M.-J. Bourque et R. Robitaille ; résultats non-publiés).

Les changements dans la sensibilité des récepteurs purinergique et muscarinique induits par la SP pourraient agir comme moyen de limiter les phénomènes gliaux Ca^{2+} -dépendants en allouant plus de place aux phénomènes de régulation Ca^{2+} -indépendants.

Un tel moyen de régulation des élévations calciques gliales serait indiqué pour le contrôle des effets gliaux sur la transmission synaptique puisqu'il a été montré que l'ATP, l'ACh et l'adénosine produisent toutes des élévations calciques dans les CSPs et que l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des CSPs est liée à la potentialisation de l'efficacité synaptique. Sachant cela, la SP devient un bon candidat pour effectuer une régulation des voies de signalisation intracellulaires, permettant d'assurer une balance correcte entre les mécanismes de potentialisation et de dépression de l'efficacité synaptique.

Toutefois, nous devons rester critique face à ces résultats, puisque si nous pouvons relier les élévations calciques gliales à une potentialisation de la TS, nous ne pouvons exclure que certaines voies potentialisatrices de la TS puissent procéder par des phénomènes Ca^{2+} -indépendants. De même, nous ne pouvons exclure la possibilité

que des voies de dépression de la TS passent par l'élévation de la $[Ca^{2+}]$ gliale (par exemple : activation de la NO synthase neuronale Ca^{2+} -dépendante).

5.3 Modulation gliale et plasticité synaptique à la JNM

Plusieurs études ont montré une implication des CSPs dans l'expression de la plasticité synaptique de la JNM de grenouille. En effet, les CSPs pourraient effectuer la recapture et/ou la relâche du glutamate, qui est impliqué dans la dépression synaptique (Pinard et al., 2003). D'autre part, ces cellules pourraient produire du NO, qui jouerait un rôle dans la dépression synaptique activité-dépendante (Thomas et Robitaille, 2001). Les CSPs pourraient aussi participer à la potentialisation de la TS, via la production de PgE_2 par une cyclooxygénase (Ca^{2+} -dépendante) suite à l'élévation de leur $[Ca^{2+}]_i$ (Pappas D. et al., 1999).

Les CSPs sont donc impliquées dans plusieurs facettes de la modulation de la plasticité synaptique à la JNM de grenouille.

À l'aide d'une élégante démonstration, l'équipe du Dr C.P. Ko a étudié certaines formes de plasticité synaptique à court terme à la JNM de grenouille après avoir sélectivement éliminé les CSPs de la préparation, par la méthode du complément (Reddy et al., 2003). Ainsi, la facilitation pairée (à un intervalle de 10 ms, tous les 5s, pour 50 stimuli) et la dépression synaptique (10 Hz / 80 s) ne semblent pas altérés par l'absence des CSPs au niveau de JNMs ayant été débarrassées de leurs CSPs de façon aiguë, en comparaison avec le muscle controlatéral demeuré intact.

Ces résultats peuvent paraître en opposition à ceux qui ont été présentés ici, montrant la relation fonctionnelle étroite qu'entretiennent les CSPs avec la synapse et leur influence sur son fonctionnement. Cependant, nous savions déjà que les neurones en cultures dépourvues de cellules gliales sont en mesure de sous-tendre les phénomènes de plasticité à court terme tels que la dépression et la facilitation (Rayport et Schacher, 1986; Montarolo et al., 1986).

Par conséquent, ce qui ressort de ces études, c'est que les neurones possèdent la machinerie nécessaire pour sous-tendre à eux seuls au moins certains phénomènes de plasticité synaptique à court terme. Dans ce contexte, la présence des CSPs pourrait assurer un niveau supplémentaire et distinct de modulation des mécanismes impliqués dans les différentes formes de plasticité à la JNM.

De plus, l'influence gliale sur la TS à un moment X reflète l'activité synaptique qui s'y est déroulée au temps X-t. Il est donc possible qu'en conditions physiologiques les composantes gliales et neuronales de la plasticité puissent s'annuler ou encore se potentialiser, selon les patrons d'activité rencontrés dans le temps.

À la lumière des ces résultats, nous pouvons donc dire que les cellules gliales sont en mesure de raffiner l'expression de la plasticité observée à une synapse donnée, mais ne sont pas indispensables à son expression. La modulation gliale de l'activité synaptique s'ajouterait donc à l'expression de la plasticité « purement » neuronale, sous forme d'un mécanisme distinct et indépendant, pouvant intervenir pour modifier l'activité synaptique et possiblement compléter l'expression totale de la plasticité dont la synapse ferait l'objet.

5.4 Facteur de sécurité et modulation de la transmission synaptique à la JNM

Le facteur de sécurité d'une synapse représente le ratio de NTs libéré par un potentiel d'action par rapport à la quantité de NTs nécessaire pour obtenir une contraction musculaire. Le facteur de sécurité du muscle *cutaneus pectoris* de grenouille est très élevé, de l'ordre de quatre. Ceci signifie que l'élément présynaptique relâche jusqu'à quatre fois la quantité nécessaire de neurotransmetteurs pour obtenir une contraction musculaire. Cette caractéristique assure le maintien de l'efficacité de la transmission synaptique (i.e. la contraction musculaire), même dans les cas d'activité prolongée à haute fréquence, pendant laquelle la quantité de NT libérée est grandement diminuée pour chaque potentiel d'action.

Pourquoi étudier la plasticité à une telle synapse, ayant un facteur de sécurité si élevé?

Il est important de comprendre que le facteur de sécurité d'une synapse varie dans le temps et en fonction de l'activité qui se déroule à la synapse. En d'autres termes, cette mesure est indicative d'une certaine marge de sécurité présente à une synapse donnée, mais elle peut varier grandement selon l'activité qui s'y déroule. En effet, on distingue deux principaux types de synapses neuromusculaires : phasique et tonique. Les synapses toniques sont retrouvées par exemple au niveau de muscles contrôlant la posture et ont une activité à basse fréquence soutenue. Au contraire, les synapses phasiques sont moins sollicitées et sous-tendent de courts épisodes

d'activité intense. Il a été montré que pour jouer leur rôle physiologiques, ces deux types de synapses ont des caractéristiques différentes.

En effet, afin de maintenir de longues périodes d'activité à basse fréquence, les synapses toniques possèdent un plus grand pool de vésicules synaptiques, mais un contenu quantique inférieur à celui des synapses phasiques. Ainsi, même si elles ont un contenu quantique plus faible, le nombre élevé de vésicules présentes à la zone active assure leur disponibilité pour la fourchette de fréquence de stimulation rencontrée *in vivo* (~ 20 Hz). Quant à elles, les synapses phasiques ont un nombre de vésicules moins grand aux zones actives, mais ces vésicules ont un contenu quantique plus élevé que celles des synapses toniques. Ces caractéristiques leur permettent d'assurer une transmission synaptique efficace, mais seulement sur de courtes périodes (quelques secondes, tel que rencontré *in vivo*). Lorsqu'une synapse phasique est stimulée pour une longue période et à haute fréquence (~ 80 Hz), elle montre rapidement une grande diminution de l'amplitude des EPPs et des manques (Reid et al., 1999).

Ces différences dans la taille du pool de vésicules synaptiques et leur contenu quantique permettent aux deux types de synapses de soutenir leur rôle physiologique selon le type d'activité qui s'y déroule. De plus, ces caractéristiques participent au maintien d'un facteur de sécurité approprié aux demandes synaptiques rencontrées par ces deux types de synapses *in vivo* afin de produire une transmission efficace. Dans ce contexte, avoir un facteur de sécurité élevé dès le départ, assure une bonne marge de manœuvre quant à la disponibilité des NTs pour l'exocytose. En effet, lors de stimulations à haute fréquence, le groupe de vésicules prêtes à la relâche s'épuise

et la terminaison nerveuse doit alors faire appel au groupe de vésicules de réserves qui doivent être mobilisées pour la relâche (Reid et al., 1999). Ce processus étant plus lent, il pourrait faire chuter le facteur de sécurité jusqu'à 50% de sa valeur de repos (Kamenskaya et al., 1975).

Or, lors de stimulations à haute fréquence telles que celles qui risquent de faire chuter le facteur de sécurité, nous pouvons présumer qu'il y aura activation des cellules gliales pérисynaptiques. Dans une telle situation, les cellules gliales pourraient ajouter une dimension au maintien du facteur de sécurité synaptique en influençant différenciellement les synapses fortes ou faibles.

Par exemple, pour les synapses phasiques à forte libération de NTs, l'influence gliale pourrait se manifester par une dépression plus marquée, afin d'éviter l'épuisement du groupe de vésicules synaptiques. De leur côté, les synapses toniques pourraient subir une influence gliale potentialisatrice plus importante, afin d'assurer le maintien d'une transmission efficace pour de longues périodes.

Ainsi, pour une synapse tonique, les cellules gliales pourraient participer à diminuer la vitesse d'exocytose et augmenter la vitesse d'endocytose lors de stimulations soutenues à haute fréquence, afin de soutenir le mieux possible la demande en vésicules synaptiques occasionnée par une telle stimulation et ainsi d'éviter les manques.

À la JNM, les travaux effectués chez l'humain montrent que dans les faits, il est très difficile de parvenir à un manque dans la transmission synaptique neuromusculaire initiée de façon volontaire. Ainsi, ce sera plutôt le muscle qui sera

réfractaire à la libération de NTs, sans pour autant que la libération de NTs ne soit compromise (Bigland-Ritchie et al., 1982).

Les éléments présynaptique et glial agissent donc de concert afin d'assurer le maintien de la relâche de NTs dans les différentes conditions de stimulation rencontrées par la synapse.

5.5 Perspectives

Nous observons la coexistence simultanée des phénomènes de potentialisation et de dépression d'origine gliale à la JNM de grenouille. Comme pour la plasticité synaptique, le résultat net des changements observés au niveau d'une synapse donnée serait donc le résultat de l'addition des contributions des événements potentialisateurs et inhibiteurs provenant à la fois de tous les compartiments cellulaires.

Les CSPs peuvent contribuer à influencer ces phénomènes de plasticité, ayant cours à la JNM étant donné leur partenariat avec les éléments pré- et postsynaptiques. Cependant, plusieurs mécanismes d'action gliale demeurent inconnus

- 1) Quels sont les NTs et modulateurs impliqués dans l'activation gliale et dans quelles conditions sont-ils relâchés préférentiellement?
- 2) Quels sont les niveaux calciques atteints au niveau des CSPs et y a-t-il un seuil qui doit être atteint pour déterminer les changements induits par la suite?
- 3) Comment s'intègrent les différents mécanismes de signalisation (NO, glutamate, prostaglandines...)?

- 4) Les cellules gliales interviennent-elles dans le recyclage des vésicules synaptiques? Comment?
- 5) Y a-t-il un rôle de la glie dans le maintien du facteur de sécurité de la JNM, qui pourrait opérer via leur recrutement dépendant de l'activité synaptique.

Il sera intéressant d'explorer ces avenues de recherche, afin de pouvoir avoir une meilleure compréhension du fonctionnement global de la JNM. En effet, tous les modes de signalisation gliaux décrits jusqu'à maintenant coexistent sans pour autant que l'on sache dans quelles circonstances ils sont recrutés, ni leurs modes d'action.

Il apparaît donc que les cellules gliales périssynaptiques de la JNM de grenouille sont en mesure de participer à plusieurs facettes du fonctionnement de cette synapse, toujours visant à maintenir l'équilibre dans son efficacité, en fonction des différents patrons d'activité rencontrés.

5.6 *Références de la discussion générale*

- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20: 666-673.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22: 2443-2450.
- Bergles DE, Jahr CE (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18: 7709-7716.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391: 281-285.
- Bigland-Ritchie B, Kukulka CG, Lippold OC, Woods JJ (1982) The absence of neuromuscular transmission failure in sustained maximal voluntary contractions. *J Physiol* 330: 265-278.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 512 (Pt 1): 197-209.
- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca^{2+} Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21: 1911-1922.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8: 429-440.
- Descarries LM, Cai S, Robitaille R (1998) Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology* 27: 827-838.
- Engelman HS, Macdermott AB (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* 5: 135-145.
- Fellin T, Carmignoto G (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* 559: 3-15.

- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43: 729-743.
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68: 138-149.
- Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2: 139-143.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8: 1069-1077.
- Kamenskaya MA, Elmqvist D, Thesleff S (1975) Guanidine and neuromuscular transmission. II. Effect on transmitter release in response to repetitive nerve stimulation. *Arch Neurol* 32: 510-518.
- Kusner LL, Kaminski HJ (1996) Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res* 730: 238-242.
- Lindgren CA, Laird MV (1994) Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Neuroreport* 5: 2205-2208.
- Ma JY, Zhao ZQ (2002) The involvement of glia in long-term plasticity in the spinal dorsal horn of the rat. *Neuroreport* 13: 1781-1784.
- Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, Yang SX, Yamakuchi M, Bao C, Hara MR, Quick RA, Cao W, O'Rourke B, Lowenstein JM, Pevsner J, Wagner DD, Lowenstein CJ (2003) Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* 115: 139-150.
- Matteoli M, Haimann C, De Camilli P (1990) Substance p-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 37: 271-275.
- McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A (1996) Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6361-6366.
- Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 6: 925-932.
- Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S (1986) A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234 (4781): 1249-54.

- Mulligan SJ, Macvicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431: 195-199.
- Narita K, Akita t, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K (1998) A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism involved in asynchronous exocytosis at frog motor nerve terminals. *J Gen Physiol* 112: 593-609.
- Newman EA (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23: 1659-1666.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18: 4022-4028.
- Pappas D., hazrati L.N., and Robitaille, R. Arachidonic acid and PGE_2 as possible glial modulators of synaptic activity at the frog neuromuscular junction. Society for neuroscience abstracts 25[part 1], 1256. 1999.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17: 7817-7830.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21: 477-484.
- Pinard A, Levesque S, Vallee J, Robitaille R (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci* 18: 3241-3250.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16: 5073-5081.
- Rayport SG, Schacher S (1986) Synaptic plasticity in vitro: cell culture of identified *Aplysia* neurons mediating short-term habituation and sensitization. *J Neurosci* 6: 759-763.
- Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko CP (2003) Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron* 40: 563-580.
- Reid B, Slater CR, Bewick GS (1999) Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci* 19: 2511-2521.
- Reist NE, Smith SJ (1992) Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7625-7629.

- Robitaille R (1995) Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 15: 7121-7131.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21: 847-855.
- Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997) Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* 504: 337-347.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille J-C, Robitaille R (2003) Involvement of glial cells in heterosynaptic depression at hippocampal Schaffer collateral-pyramidal cell synapses. 2003 Abstract Viewer/Itinerary Planner Program No. 378.17 Washington, DC: Society for Neuroscience, Online..
- Sollner TH, Sequeira S (2003) S-nitrosylation of NSF controls membrane trafficking. *Cell* 115: 127-129.
- Starke K, Gothert M, Kilbinger H (1989) Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 69: 864-989.
- Thomas LS, Jane DE, Harris JR, Croucher MJ (2000) Metabotropic glutamate autoreceptors of the mGlu(5) subtype positively modulate neuronal glutamate release in the rat forebrain in vitro. *Neuropharmacology* 39: 1554-1566.
- Thomas S, Robitaille R (2001) Differential Frequency-Dependent Regulation of Transmitter Release by Endogenous Nitric Oxide at the Amphibian Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21: 1087-1095.
- Wilcox KS, Dichter MA (1994) Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA_B autoreceptor activation. *J Neurosci* 14: 1775-1788.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6: 43-50.

6 Chapitre sixième : Conclusions de la thèse

La communication bidirectionnelle étroite entre les neurones et les cellules gliales est maintenant bien établie et plusieurs rôles importants de la glie dans divers phénomènes synaptiques ont été mis en lumière. Il faut cependant garder en tête que l'efficacité du système nerveux repose en premier lieu sur le réseau de communication ultrarapide sous-tendu par l'activité neuronale, sur lequel vient se greffer l'apport glial.

Puisque virtuellement tous les sites synaptiques sont appelés à produire l'activation gliale, et étant donné tous les sites d'action possibles des cellules gliales ainsi que leurs différents modes d'interaction avec plusieurs synapses, nous pouvons entrevoir la grande richesse et la flexibilité qu'offre ce système.

Ainsi, l'étendue de l'activation gliale pourrait déterminer le rayon d'action de la modulation produite par un seul astrocyte et de ce fait le groupe de neurone contactés par cet astrocyte demeure susceptible à une modulation synchrone de ses activités.

De plus, puisque les élévations calciques gliales du SNC peuvent se propager à travers le syncytium glial, elles peuvent rendre possible une modulation distante des synapses n'étant pas contactées par l'astrocyte responsable de la génération de la vague calcique.

D'autre part, l'implication gliale dans la modulation d'autres fonctions, telles que le contrôle du tonus vasculaire, l'activation des cellules microgliales responsables

des réactions inflammatoires, sans oublier le maintien des concentrations ioniques du milieu, fait de ces cellules des éléments importants du bon fonctionnement global du système nerveux.

Au fil de l'avancement de nos connaissances sur les implications de la glie dans la transmission synaptique, nous commençons à découvrir l'étendue de leur influence et leurs modes de fonctionnement complexes, insoupçonnés jusque là.

Bien que plusieurs aspects du fonctionnement des interactions neurone – glie – neurone nous échappent toujours, nous pouvons maintenant dire que les neurones sont assistés des cellules gliales dans le traitement et le transfert de l'information du système nerveux.

